

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL  
BIOPOLÍMERO LEVAN PARA DIFERENTES  
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

MEMORIA QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
INGENIERÍA QUÍMICA (CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICAS) POR  
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, PRESENTA:

D. ÁLVARO GONZÁLEZ GARCINUÑO





La Dra. Dña. Eva María Martín del Valle, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca,

Informa:

Que la memoria titulada: “***Producción y caracterización del biopolímero levan para diferentes aplicaciones biomédicas***”, que, para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado “Ciencia y Tecnología Químicas (RD 99/2011)”, presenta **D. Álvaro González Garcinuño**, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca y que, considerando que constituye un trabajo de tesis.

Autoriza:

Su presentación ante la Escuela de Doctorado de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el presente informe, en Salamanca  
a 20 de septiembre de 2019.

Dña. Eva María Martín del Valle





**A mi padre, por tanto**



# Agradecimientos

En primer lugar, a mi directora, la profesora Eva Martín del Valle, por darme la oportunidad de trabajar en investigación, de realizar esta tesis doctoral, y por compartir sueños y desvelos por la ciencia. De igual modo, al profesor Miguel Ángel Galán, que, sin ser director de tesis, me enseñó algunas lecciones importantes sobre la vida y la academia.

A mis compañeros del grupo de investigación, con quienes las horas de dedicación se hacen más llevaderas. A los que estuvieron: Cristina, Jesús, Montaña, Gema, Héctor; y a los que están: Celia, Inma, José, Antonio, Fernando, Rubén, Sergio, Milena, Chema, Audelino, Jesús y Nekane. Gracias por el ambiente de trabajo, la ayuda y la disposición siempre conmigo. También a Vicente, y a Toñi.

De igual forma, al grupo de investigación del Prof. Ángel Domínguez, por prestarnos su consejo e instalaciones para algunos de los experimentos. También, a los servicios centrales de investigación de la Universidad (espectrometría de masas, microscopía electrónica y análisis químico elemental), por ayudarme en la obtención de diferentes datos útiles para esta tesis.

Al grupo BSEL que me acogió durante mi estancia en Londres, en especial a su director Sakis, y a Antonio Grilo, por enseñarme tanto y hacer de mi tiempo allí una estupenda experiencia.

A la comunidad educativa del Colegio Mayor Tomás Luis de Victoria (al personal de administración y servicios, a los educadores y a

los colegiales), donde me formé como profesional estudiando el grado, y donde he vivido los últimos años. Gracias por compartir conmigo la vida, por ayudarme a crecer, por recordarme cada mañana que merece la pena entregarse, porque *“lo que no se da, se pierde”*.

A mis amigos de Ávila: Fabio, Manuel, Prito, Quique, Michel, Borja, Anabel, Laura, Rebeca, Cynthia, Irene y Rocío; por tantos años juntos y tanta confianza, por ser mi sostén en la tristeza, y grata compañía en la alegría.

A mi familia, especialmente a mi madre y a mi hermano, que han compartido conmigo los esfuerzos de esta tesis, y siempre han estado para lo que necesitara. Y finalmente, a mi padre, a quien dedico esta tesis, por acompañar desde el Cielo este doctorado.

*“La libertad, querido Sancho, es uno de los más preciosos dones que a los hombres dieron los cielos; con ella no pueden igualarse los tesoros que encierra la tierra ni el mar encubre; por la libertad, así como por la honra, se puede y debe aventurar la vida”*

**Don Quijote de la Mancha. Capítulo LVIII**

**Miguel de Cervantes Saavedra**



# ÍNDICE GENERAL

Páginas

Índice de tablas	XVII
Índice de figuras	XIX
Índice de ecuaciones y reacciones	XXXI
Nomenclatura	XXXV
Resumen	XLI
Abstract	LI

<b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. La biotecnología y el reto sanitario actual	3
1.1. Los exopolisacáridos	12
1.2.1. Alginato	17
1.2.2. Dextrano	18
1.2.3. Goma xantana	19
1.2.4. Curdlano	20
1.2.5. Goma gellan	20
1.2.6. Levano	21
1.2.7. Ácido hialurónico	22
1.2.8. Pululano	23
1.2.9. Carragenano	24
1.3. Aplicaciones de los exopolisacáridos en biomedicina	25
1.3.1. Cicatrización de heridas	27
1.3.2. Regeneración ósea e ingeniería de tejidos	28
1.3.3. Nanopartículas para liberación de fármacos	29
1.4. Biopolímeros a base de fructosas. Levano	30
1.4.1. La enzima levan-sacarasa. Mecanismo catalítico	31
1.4.2. La producción microbiana de levan	35
1.4.3. La purificación de la enzima. Trabajo con sistemas libres de microorganismos ( <i>Cell-free systems</i> )	41
1.5. Propiedades del polímero levan	44
1.5.1. Solubilidad	44
1.5.2. Resistencia a la tracción	44
1.5.3. Viscosidad	45
1.5.4. Otras propiedades	46
1.6. Las principales aplicaciones de levan en la industria	47

farmacéutica	
1.6.1. Agente anti-inflamatorio	47
1.6.2. Agente anti-tumoral	48
1.6.3. Agente anti-oxidante	50
1.6.4. Soporte para proliferación celular	51
1.6.5. Prebiótico	52
1.6.6. Producción de sistemas de liberación controlada de fármacos	53
1.6.7. Producción de films	56
<b>Capítulo 2: Objetivos</b>	<b>61</b>
 <b>Capítulo 3: Estudio bioinformático de la evolución de la enzima levan-sacarasa</b>	 <b>69</b>
3.1. Introducción. La enzima levan-sacarasa	71
3.2. Métodos empleados en el estudio bioinformático	73
3.3. Resultados	75
3.3.1. Obtención y análisis de las secuencias	75
3.3.2. Alineamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos	78
3.4. Conclusiones	85
 <b>Capítulo 4: Producción de polifruktosas por vía microbiana</b>	 <b>87</b>
4.1. Introducción	89
4.2. Crecimiento microbiano y producción de polifruktosas	92
4.2.1. Selección de especies y condiciones de cultivo	92
4.2.2. Cuantificación y purificación de biomasa y polifruktosas	93
4.2.3. Influencia del sustrato en el crecimiento microbiano y en la producción de polifruktosas	96
4.2.4. Estudio de la inhibición de la producción de polifruktosa	102
4.3. Estudio cinético de la producción microbiana	104
4.3.1. Formulación del modelo	104
4.3.2. Ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto	105



4.4. Caracterización físico-química de las polifruktosas producidas	110
4.4.1. Caracterización química: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier, Análisis Termogravimétrico y Resonancia Magnética Nuclear	110
4.4.2. Composición porcentual del polímero	113
4.4.3. Determinación del peso molecular	114
4.5. Caracterización de las nanopartículas y del proceso de auto-ensamblado	120
4.5.1. Caracterización por DLS (distribución de tamaño, potencial zeta y estabilidad)	121
4.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	124
4.5.3. Determinación de porosidad por BET	126
4.5.4. Adsorción no-específica de proteínas	127
4.5.5. Determinación de la Concentración de Agregación Crítica (CAC)	129
4.5.6. Determinación del Segundo Coeficiente del Virial	131
4.6. Utilización de otros medios para la producción de polifruktosa	133
4.6.1. Aprovechamiento de los residuos de la industria alimentaria	133
4.6.2. Valoración económica del uso de estos residuos	135
4.7. Conclusiones	138

## **Capítulo 5: Producción de polifruktosa por vía enzimática**

5.1. Introducción	143
5.2. Método de producción enzimático	146
5.3. Caracterización de las polifruktosas producidas por vía enzimática	148
5.3.1. Caracterización química de las polifruktosas (TGA, FT-IR, H-RMN, BET)	148
5.3.2. Caracterización de las nanopartículas obtenidas	154
5.3.3. Estudio del proceso de auto-ensamblado	158
5.4. Estudio de diferentes parámetros involucrados en la síntesis enzimática	162
5.4.1. Efecto de la concentración inicial de sacarosa	166

5.4.2. Efecto de la concentración de enzima	173
5.4.3. Efecto de la adición de otros azúcares	176
5.4.3.1. Efecto de la adición de glucosa	176
extra	
5.4.3.2. Efecto de la adición de lactosa extra	179
5.4.4. Efecto de la temperatura	182
5.4.5. Efecto de la adición de ATP	186
5.4.6. Efecto de la adición del ion manganeso	192
5.4.7. Efecto de sustratos diferentes en la reacción	196
enzimática: rafinosa	
5.5. Comparación con el producto comercial y con la	204
obtención microbiana	
5.6. Conclusiones	206

## **Capítulo 6: Estudio para la formación de nanopartículas de levan: Modelado de cinéticas y auto-ensamblado.**

**209**

6.1. Introducción	211
6.2. Experimentación previa a la formulación del modelo	213
6.2.1. Comprobación del envenenamiento del	213
catalizador	
6.2.2. Estudio de la cinética de desagregación de las	217
partículas	
6.3. Formulación del modelo	219
6.4. Estimación de parámetros	223
6.5. Resultados de las simulaciones	233
6.6. Conclusiones	237

## **Capítulo 7: Aproximaciones biotecnológicas para producir levan: estudio de transferencia de materia y evaluación económica.**

**239**

7.1. Introducción	241
7.2. Diseño del proceso y preparación de los soportes	244
7.2.1. BSTR	245
7.2.2. PBR	245
7.2.3. MR	247
7.3. Rendimiento de la inmovilización	249
7.4. Efecto de la concentración de sustrato	250
7.5. Efecto del caudal	253

7.6. Efecto de la porosidad en el reactor de lecho fijo	255
7.7. Efecto de la longitud en el reactor monolítico	257
7.8. Pérdida de carga en las columnas	259
7.9. Estudios de estabilidad enzimática	261
7.10. Modelo de transferencia de materia	264
7.10.1. Transferencia de materia en reactor de lecho fijo	265
7.10.2. Transferencia de materia en reactor monolítico	272
7.11. Caracterización de las nanopartículas producidas	278
7.12. Análisis económico de la rentabilidad de la inmovilización	282
7.13. Conclusiones	293

## **Capítulo 8: Aplicaciones biomédicas de levan** **295**

8.1. Introducción	297
8.2. Uso como sistema transportador de fármacos	299
8.2.1. Adsorción de 5-fluorouracilo	300
8.2.2. Ensayos in vitro en líneas celulares	306
8.3. Uso combinado con plata en geles como bacteriostático	313
8.3.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas combinadas con plata	314
8.3.2. Preparación de geles con nanopartículas	320
8.3.3. Efecto bacteriostático	320
8.3.4. Modelización de la liberación y efecto de nanopartículas de plata y polifruktosa desde el gel	325
8.3.4.1. Modelado de la supervivencia	326
8.3.4.2. Modelado de las nanopartículas en el gel	330
8.3.4.3. Modelado de las nanopartículas en el medio líquido	332
8.3.5. Simulación y estimación de parámetros	333
8.4. Recubrimiento de prótesis de titanio para prevención de infecciones en implantes	342
8.4.1. Proceso de recubrimiento de la prótesis con el polímero levan	344
8.4.2. Caracterización del recubrimiento	346
8.4.2.1. Difracción de Rayos-X	346
8.4.2.2. Microscopía electrónica de barrido	348

8.4.3. Estudios celulares con <i>Staphylococcus</i> . Eficiencia de prevención de la adhesión celular	352
<b>Capítulo 9: Conclusiones</b>	<b>359</b>
<b>Capítulo 10: Bibliografía</b>	<b>369</b>
<b>Resultados de la estancia de investigación en el grupo BSEL</b>	<b>399</b>
<b>Anexo I</b>	<b>441</b>
<b>Anexo II</b>	<b>445</b>
<b>Anexo III</b>	<b>451</b>
<b>Publicaciones derivadas de la tesis doctoral</b>	<b>455</b>
<b>Otras publicaciones (no derivadas de la tesis doctoral)</b>	<b>531</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales exopolisacáridos utilizados en biomedicina: carga, propiedades y aplicaciones	26
Tabla 1.2. Relaciones de propiedades y ventajas-aplicaciones del biopolímero levan en biomedicina	46
Tabla 3.1. Géneros de bacteria con enzima levan-sacarasa secuenciada	76
Tabla 4.1. Determinación de coeficientes de la ecuación de Leudeking-Piret	108
Tabla 4.2. Coeficientes estequiométricos determinados desde los datos experimentales	109
Tabla 4.3. Estimación de costes para la producción de polifruktosa desde <i>B. atrophaeus</i> . Comparativa entre el medio enriquecido y el medio que emplea residuos de la industria alimentaria	136
Tabla 5.1. Rendimientos de conversión con la adición de ion $Mn^{2+}$ a la reacción	195
Tabla 5.2. Comparación entre los polímeros de tres fuentes diferentes	205
Tabla 6.1. Modelos de varianza para estimación de parámetros junto a su correspondiente descripción matemática	224
Tabla 6.2. Resultados obtenidos de la estimación de parámetros del modelo	228
Tabla 7.1. Velocidad inicial obtenida en función de la concentración inicial de sustrato	251
Tabla 7.2. Valores del modelo de transferencia de materia para cada uno de los experimentos realizados con reactor de lecho fijo	270
Tabla 7.3. Valores del modelo de transferencia de materia para cada uno de los experimentos realizados con el reactor de lecho fijo	276

Tabla 7.4. Estimación de costes de Capital Fijo para ambas plantas	289
Tabla 7.5. Estimación de costes anuales de producción para ambos tipos de plantas	291
Tabla 8.1. Valores de los parámetros del modelo dosis-respuesta para ambas bacterias	329
Tabla 8.2. Parámetros estimados y estadística de la estimación para la liberación de NPs desde el gel en ambas especies	335
Tabla 8.3. Valores de los parámetros usados para las simulaciones	339
Tabla 8.4. Composición elemental de las prótesis analizadas por EDX	351

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mercado de la biotecnología por secciones en los Estados Unidos de América en 2007 y proyección para el año 2024	7
Figura 1.2. Evolución de la industria de la nanobiotecnología en salud, por sub-sectores, desde 1989 hasta 2011	9
Figura 1.3. Esquema-resumen de las clasificaciones de los diferentes biopolímeros, según su origen (azul) y según su estructura (naranja)	14
Figura 1.4. Estructura química del biopolímero alginato	17
Figura 1.5. Estructura química del biopolímero dextrano	18
Figura 1.6. Estructura química del biopolímero goma xantana	19
Figura 1.7. Estructura química del biopolímero curdlano	20
Figura 1.8. Estructura química del biopolímero goma gellan	21
Figura 1.9. Estructura química del biopolímero levan	22
Figura 1.10. Estructura química del ácido hialurónico	23
Figura 1.11. Estructura química del biopolímero pululano	23
Figura 1.12. Estructura química del biopolímero $\kappa$ -carragenano	24
Figura 1.13. Estructura del biopolímero levan. Representación de la cadena lineal $\beta$ (2-6) y de las ramificaciones $\beta$ (1-6)	30
Figura 1.14. Representación de la estructura cuaternaria de la levan-sacarasa de <i>B. subtilis</i>	32

Figura 1.15. Esquema del mecanismo catalítico de la enzima levan-sacarasa	35
Figura 1.16. Esquema de las etapas de purificación del polímero a partir del medio de cultivo	38
Figura 1.17. Etapas en la producción microbiana del polímero levan	40
Figura 1.18. Inhibición del crecimiento de tumores según el peso molecular del biopolímero	49
Figura 1.19. Membranas con diferentes concentraciones de biopolímero introducido (0, 20 y 50% respectivamente)	52
Figura 1.20. Efecto de la encapsulación de ICG (indocianina Green) en la detección de tumores. Comparación frente al tratamiento en forma libre	54
Figura 1.21. Film obtenido de la combinación de levan con montmorillonita	57
Figura 3.1. Árbol filogenético de las especies que expresan enzima levan-sacarasa	79
Figura 3.2. Alineamiento múltiple de las regiones semejantes de levan-sacarasa en bacterias Gram+ y Gram-. El origen es siempre el aminoácido metionina. Los asteriscos indican igualdad y los puntos indican cambios conservativos. Las regiones con mayor similitud se encuentran enmarcadas y numeradas por orden	81
Figura 4.1. Imágenes de microscopía óptica de las bacterias seleccionadas: <i>B. subtilis</i> (izquierda) y <i>A. nectaris</i> (derecha)	93
Figura 4.2. Esquema del proceso de purificación de la polifruktosa obtenida de forma enzimática	96
Figura 4.3. Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento de dos especies bacterianas: a) <i>A. nectaris</i> y b) <i>B. atrophaeus</i>	98



Figura 4.4. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de polifruktosa desde: a) <i>A. nectaris</i> y b) <i>B. atrophaeus</i>	99
Figura 4.5. Esquema de la producción de polifruktosa desde las dos especies empleadas. M: membrana, LS: levan-sacarasa, PW: pared de péptidoglicano, IM: membrana interna, OM: membrana externa	101
Figura 4.6. Efecto de la inhibición por glucosa añadida en el cultivo de <i>A. nectaris</i>	103
Figura 4.7. Espectro de infrarrojo de la polifruktosa obtenida de forma microbiana con <i>A. nectaris</i>	111
Figura 4.8. Evolución de la pérdida de masa por descomposición térmica analizada por TGA, de la polifruktosa producida por <i>A. nectaris</i>	112
Figura 4.9. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (H-RMN) de la polifruktosa producida por <i>A. nectaris</i>	113
Figura 4.10. Peso molecular calculado de la polifruktosa de <i>A. nectaris</i> , por dos técnicas diferentes. a) MALDI-TOF, b) SEC-GPC	117
Figura 4.11. Cromatograma GPC obtenido para el polímero levan cuando se trabaja a valores inferiores a la concentración crítica	118
Figura 4.12. Caracterización por DLS de las nanopartículas de polifruktosa bacteriana de <i>A. nectaris</i> . a) Distribución de tamaño de partícula en número, b) Distribución de zeta potencial	121
Figura 4.13. Caracterización por DLS de las nanopartículas de polifruktosa bacteriana de <i>B. atrophaeus</i> . a) Distribución de tamaño de partícula en número, b) Distribución de zeta potencial	123

Figura 4.14. Estabilidad de las partículas obtenidas por ambos tipos de bacterias durante los primeros 15 días tras la síntesis	124
Figura 4.15. Imágenes de las nanopartículas obtenidas por TEM	125
Figura 4.16. Isotherma de adsorción BET, para determinación de la porosidad de las nanopartículas de polifruktosas obtenidas de forma microbiana	127
Figura 4.17. Espectro de fluorescencia de pireno para determinar la concentración de agregación crítica de nanopartículas desde vía bacteriana	130
Figura 4.18. Representación del gráfico de Debye para la polifruktosa obtenida de forma microbiana desde <i>A. nectaris</i>	132
Figura 4.19. Efecto de la incorporación de residuos de naranja como fuente de nitrógeno en el crecimiento de <i>A. nectaris</i> y de <i>B. atrophaeus</i>	135
Figura 5.1. Esquema del proceso de síntesis y precipitación de polifruktosa vía enzimática	147
Figura 5.2. Espectro de TGA para polifruktosa obtenida vía enzimática	149
Figura 5.3. Espectro de infrarrojo para polifruktosa obtenida vía enzimática	149
Figura 5.4. Espectro de resonancia magnética nuclear para polifruktosa obtenida vía enzimática	150
Figura 5.5. Isotherma BET para adsorción y desorción de N <sub>2</sub> en polifruktosa producida vía enzimática	150
Figura 5.6. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF para polifruktosa producida por vía enzimática	152
Figura 5.7. Cromatograma obtenido por SEC-GPC para polifruktosa por vía enzimática, a concentración superior a	153

la crítica

Figura 5.8. Espectro de ESI-IT para polifruetosa producida vía bacteriana	154
Figura 5.9. Distribución de tamaño de partícula con polifruetosa obtenida vía enzimática	155
Figura 5.10. Distribución de la carga eléctrica superficial (Zeta potencial) de las nanopartículas obtenidas desde polifruetosa de vía enzimática	155
Figura 5.11. Evolución del tamaño de las nanopartículas con el tiempo al ser conservadas en reposo	156
Figura 5.12. Imágenes de microscopía electrónica de las nanopartículas obtenidas por vía enzimática	157
Figura 5.13. a) Espectro de fluorescencia de pireno (longitud de onda de 335 nm, en un rango de concentraciones de polifruetosa de 0.02 a 1.2 mg/mL); b) Representación de la intensidad de pireno, emitida a 373 nm como función de la concentración de polifruetosa	158
Figura 5.14. Representación del gráfico de Debye para la determinación del segundo coeficiente del virial en la polifruetosa obtenida vía enzimática	160
Figura 5.15. Esquema de la reacción de polimerización de fructosa de forma enzimática. Presencia y papel de los diferentes factores en la reacción	162
Figura 5.16. Recta de calibrado de la concentración de polifruetosa y la señal de intensidad emitida por DLS	164
Figura 5.17. Recta de calibrado que relaciona la Intensidad corregida con la Concentración de NPs de polifruetosa	166
Figura 5.18. Efecto de la concentración de sacarosa en el tamaño de las nanopartículas producidas de forma enzimática	167

Figura 5.19. Efecto de la concentración inicial de sacarosa en la producción de nanopartículas de polifruktosa por vía enzimática	169
Figura 5.20. Evolución de la polidispersión (PDI) con el tiempo, para las diferentes concentraciones de sacarosa en la producción enzimática de polifruktosa	170
Figura 5.21. Espectros de masas para cada una de las diferentes concentraciones iniciales de sustrato	172
Figura 5.22. Efecto de la proporción relativa de enzima en el tamaño de las nanopartículas de polifruktosa producida de forma enzimática	173
Figura 5.23. Evolución de la producción de nanopartículas con el tiempo a diferentes proporciones relativas de enzima en la reacción	174
Figura 5.24. Espectros de masas, obtenidos por MALDI-TOF para dos concentraciones diferentes de enzima en la reacción (0.2 y 0.6 µg/mL)	175
Figura 5.25. Evolución del tamaño de partículas cuando se añaden diferentes concentraciones de glucosa extra al medio de reacción	177
Figura 5.26. Evolución de la concentración de nanopartículas bajo diferentes concentraciones de glucosa en el medio de reacción	178
Figura 5.27. Evolución del tamaño de las nanopartículas de polifruktosa tras la adición extra de diferentes concentraciones de lactosa	180
Figura 5.28. Evolución de la concentración de partículas de polifruktosa con diferentes concentraciones de lactosa en el medio de reacción	181
Figura 5.29. Evolución del tamaño de partícula en función de la temperatura de reacción	183

Figura 5.30. Evolución de la concentración de nanopartículas al ser producidas de forma enzimática a diferentes temperaturas	183
Figura 5.31. Respuesta de las nanopartículas de polifruktosa a la temperatura. Eje izquierdo: tamaño de las partículas. Eje derecho: Índice de polidispersión	185
Figura 5.32. Simulación de la estructura terciaria de la proteína levan-sacarasa y del residuo de interacción con ATP	188
Figura 5.33. Efecto de la adición de ATP en el tamaño medio de las nanopartículas de polifruktosa	189
Figura 5.34. Efecto de la adición de ATP en la producción de nanopartículas de polifruktosa	190
Figura 5.35. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF tras la adición de ATP	191
Figura 5.36. Evolución de tamaño de partícula a distintas concentraciones de $Mn^{2+}$	193
Figura 5.37. Evolución de la producción de nanopartículas a diferentes concentraciones del ion $Mn^{2+}$	194
Figura 5.38. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF tras la adición de diferentes concentraciones del ion $Mn^{2+}$	196
Figura 5.39. Estructura química del trisacárido rafinosa	197
Figura 5.40. Caracterización de nanopartículas obtenidas desde rafinosa: distribución de tamaño de partícula y de carga superficial (Z-potencial)	198
Figura 5.41. Representación del gráfico de Debye para la determinación del segundo coeficiente del virial de polifruktosa obtenida desde rafinosa	199
Figura 5.42. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF	200

para moléculas de polifruktosas producidas desde rafinosa

Figura 5.43. Evolución de la concentración de nanopartículas de polifruktosa según el sustrato empleado (sacarosa y rafinosa)	201
Figura 5.44. Evolución del tamaño de partícula según el sustrato (sacarosa y rafinosa)	202
Figura 6.1. Evolución del tamaño de partícula en la síntesis de polímero. Efecto de la adición de enzima nueva (ocurre en el momento que indica la flecha)	215
Figura 6.2. Evolución de la concentración de nanopartículas. Efecto de la adición de enzima nueva (ocurre en el momento que señala la flecha)	216
Figura 6.3. Esquema del equilibrio de agregación-desagregación en la obtención de nanopartículas a partir de cadenas libres de polifruktosa	217
Figura 6.4. Cinética de desagregación de las partículas de levan	218
Figura 6.5. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 45 g/L	229
Figura 6.6. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 60 g/L	230
Figura 6.7. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 75 g/L	230
Figura 6.8. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 90 g/L	231
Figura 6.9. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 105 g/L	231
Figura 6.10. Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 120 g/L	232

Figura 6.11. Simulación de la concentración de polímero en el sistema (en forma libre y formando nanopartículas)	233
Figura 6.12. Simulación de los valores de $K_{agg1}$ en los instantes iniciales de la reacción	235
Figura 7.1. Esquema de las tres configuraciones de reactores estudiadas	244
Figura 7.2. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de los dos reactores heterogéneos	252
Figura 7.3. Efecto del caudal de operación en los dos reactores heterogéneos	253
Figura 7.4. Efecto de la porosidad en el reactor de lecho fijo. A) Cinética de desaparición de sustrato para diferentes velocidades. B) Cálculo de la velocidad inicial y representación en relación con la porosidad del reactor	256
Figura 7.5. Efecto de la longitud del monolito. A) Cinética de desaparición de sustrato para diferentes longitudes de monolito. B) Cálculo de la velocidad inicial, normalizada por la longitud y representación frente a la longitud del mismo	258
Figura 7.6. Representación de la pérdida de carga generada por ambos soportes a diferentes caudales de operación	260
Figura 7.7. Cinética de desaparición de sustrato para la enzima tras el proceso de elución y para la enzima en su estado nativo, libre	262
Figura 7.8. Diagrama de contorno de las simulaciones de concentración de sustrato en el reactor de lecho fijo. Izquierda: representación del reactor completo. Derecha: ampliación a una sola esfera de alginato	271
Figura 7.9. Simplificación del sistema de canales y de reacción del reactor monolítico	273
Figura 7.10. Diagrama de contorno de las simulaciones de concentración de sustrato en el reactor monolítico	277

Figura 7.11. Distribución de tamaño de partícula para las NPs producidas desde los tres tipos diferentes de reactores.	279
Figura 7.12. Distribución de tamaño de las nanopartículas obtenidas en el reactor de lecho fijo, en el tanque, y tras extraer polímero del soporte.	281
Figura 7.13. Diagrama de flujo de una planta con un reactor de lecho fijo para la producción de levan	285
Figura 7.14. Diagrama de flujo de una planta con un reactor monolítico para la producción de levan	286
Figura 8.1. Calibrado para la determinación de 5-FU por espectrofotometría de UV a 260 nm.	302
Figura 8.2. Distribución de tamaño de partícula para nanopartículas de levan funcionalizadas con 5-FU.	304
Figura 8.3. Distribución de carga superficial para nanopartículas de levan funcionalizadas con 5-FU.	305
Figura 8.4. Resultados <i>in vitro</i> de viabilidad celular en la línea BT474. Efecto del fármaco contenido en nanopartículas.	308
Figura 8.5. Resultados <i>in vitro</i> de viabilidad celular en la línea BT474. Efecto del fármaco en forma libre.	309
Figura 8.6. Resultados <i>in vitro</i> de viabilidad celular en la línea HCT116. Efecto del fármaco contenido en nanopartículas.	310
Figura 8.7. Resultados <i>in vitro</i> de viabilidad celular en la línea HCT116. Efecto del fármaco en forma libre.	311
Figura 8.8. Espectro FT-IR de las nanopartículas de plata-levan (rojo) y levan solo (negro).	316
Figura 8.9. Histograma de la distribución de tamaño de partícula medida por DLS.	317



Figura 8.10. Distribución de carga superficial de las nanopartículas.	318
Figura 8.11. Imagen TEM de las nanopartículas de leván-plata.	318
Figura 8.12. Relación dosis-respuesta de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> al tratamiento con NPs de leván-plata.	322
Figura 8.13. Curvas de supervivencia para ambas bacterias con las NPs atrapadas en los geles de alginato.	324
Figura 8.14. Diseño experimental y etapas para la formulación del modelo de liberación y acción de las nanopartículas de plata.	325
Figura 8.15. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto único – Diana única.	328
Figura 8.16. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto múltiple - Diana única.	328
Figura 8.17. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto único – Diana múltiple.	329
Figura 8.18. Ajuste de los datos experimentales al modelo, para las concentraciones de 50, 80, 110 ppm en <i>B. subtilis</i> .	337
Figura 8.19. Ajuste de los datos experimentales al modelo, para las concentraciones de 50, 80, 110 ppm en <i>E. coli</i> .	338
Figura 8.20. Simulación de la liberación de NPs y supervivencia de las bacterias.	340
Figura 8.21. Perfil de concentraciones de NPs en diferentes alturas de pocillo a lo largo del tiempo.	341
Figura 8.22. Esquema sobre el diseño experimental de la polimerización de leván alrededor de una prótesis de titanio, aluminio y vanadio.	345
Figura 8.23. Patrón de difracción de rayos-X para la prótesis de Ti-Al-V recubierta con el biopolímero leván.	347

Figura 8.24. Ampliación del patrón XRD, en la sección 15°-25°.	348
Figura 8.25. Imágenes de microscopía SEM de prótesis sin recubrir (izquierda) y prótesis recubierta (derecha).	349
Figura 8.26. Vistas de alzado y perfil de la pieza de prótesis una vez recubierta.	350
Figura 8.27. Espectros obtenidos por análisis EDX de las imágenes de microscopía electrónica.	351
Figura 8.28. Efecto del recubrimiento en la adhesión y crecimiento de bacterias. Placas A y B: prótesis no recubiertas. Placas C y D: prótesis recubiertas con levan.	353

## ÍNDICE DE ECUACIONES Y REACCIONES

Ecuación 4.1.	94
Ecuación 4.2.	94
Ecuación 4.3.	94
Ecuación 4.4.	95
Ecuación 4.5.	104
Ecuación 4.6.	104
Ecuación 4.7.	104
Ecuación 4.8.	105
Ecuación 4.9.	105
Ecuación 4.10.	106
Ecuación 4.11.	106
Ecuación 4.12.	131
Ecuación 5.1.	165
Ecuación 5.2.	165
Ecuación 6.1.	220
Ecuación 6.2.	220
Ecuación 6.3.	221
Ecuación 6.4.	221
Ecuación 6.5.	221
Ecuación 6.6.	222
Ecuación 6.7.	222
Ecuación 6.8.	223
Ecuación 6.9.	225
Ecuación 7.1.	250

Ecuación 7.2.	264
Ecuación 7.3.	264
Ecuación 7.4.	265
Ecuación 7.5.	265
Ecuación 7.6.	265
Ecuación 7.7.	265
Ecuación 7.8.	266
Ecuación 7.9.	266
Ecuación 7.10.	266
Ecuación 7.11.	266
Ecuación 7.12.	267
Ecuación 7.13.	267
Ecuación 7.14.	267
Ecuación 7.15.	268
Ecuación 7.16.	268
Ecuación 7.17.	268
Ecuación 7.18.	268
Ecuación 7.19.	268
Ecuación 7.20.	269
Ecuación 7.21.	272
Ecuación 7.22.	272
Ecuación 7.23.	272
Ecuación 7.24.	272
Ecuación 7.25.	272
Ecuación 7.26.	273

Ecuación 7.27.	274
Ecuación 7.28.	274
Ecuación 8.1.	302
Ecuación 8.2.	303
Ecuación 8.3.	307
Ecuación 8.4.	326
Ecuación 8.5.	327
Ecuación 8.6.	327
Ecuación 8.7.	330
Ecuación 8.8.	330
Ecuación 8.9.	331
Ecuación 8.10.	331
Ecuación 8.11.	331
Ecuación 8.12.	331
Ecuación 8.13.	332
Ecuación 8.14.	332
Ecuación 8.15.	333



## NOMENCLATURA

---

5-ASA	Ácido 5-amino salicílico
5-FU	5-fluorouracilo
A	Área transversal (m <sup>2</sup> )
a	Área específica para la transferencia (m <sup>-1</sup> )
A <sub>2</sub>	Segundo coeficiente del virial
Abs	Absorbancia
ATP	Adenosin trifosfato
b <sub>ch</sub>	Espacio entre canales (m)
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BSA	Albúmina de suero bovino (siglás en inglés)
C	Costes anuales de producción (€)
C <sub>5FU</sub>	Concentración de 5-fluorouracilo (µg/mL)
CAC	Concentración de agregación crítica (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>biomasa</sub>	Concentración de biomasa (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>enz</sub>	Concentración de enzima (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>Fru</sub>	Concentración de fructosa (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>Glu</sub>	Concentración de glucosa (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>i</sub>	Valor calculado de la medida i
C <sub>in</sub>	Concentración dentro del gel (ppm)
C <sub>int</sub>	Concentración de nanopartículas en la interfase (ppm)
C <sub>l</sub>	Concentración de nanopartículas en medio líquido (ppm)
C <sub>NPs</sub>	Concentración de nanopartículas (ppm)
C <sub>PF</sub>	Concentración total de polifrutosa (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>PF(libre)</sub>	Concentración de polifrutosa en forma libre (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>PF(part)</sub>	Concentración de polifrutosa en nanopartículas (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>polifrutosa</sub>	Concentración total de polifrutosa (g·L <sup>-1</sup> )
C <sub>s</sub> *	Concentración adimensional de sacarosa
C <sub>Sb</sub>	Concentración de sacarosa en el bulk (mM)
C <sub>Si</sub>	Concentración de sacarosa en el interior (mM)
C <sub>Ss</sub>	Concentración de sacarosa en la superficie (mM)
C <sub>s</sub> <sup>input</sup>	Concentración de sacarosa a la entrada del reactor (mM)

$C_s^{output}$	Concentración de sacarosa a la salida del reactor (mM)
$C_{sur}$	Concentración de nanopartículas en la superficie bacteriana (ppm)
D	Tasa de dilución ( $s^{-1}$ )
Dif	Coeficiente de difusión ( $m^2/s$ )
$D'_s$	Difusividad efectiva de la sacarosa ( $m^2/s$ )
$D_0$	Dosis mínima inhibitoria (ppm)
$Da$	Número adimensional de Damköhler
$d_{ch}$	Diámetro promedio del canal (m)
$D_{ef}$	Difusividad efectiva de las nanopartículas ( $m^2/s$ )
DLCA	Agregación limitada por la difusión (siglas en inglés)
DLS	Dispersión dinámica de luz (siglas en inglés)
$DL_{50}$	Dosis letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
$D^{ose}$	Dosis (ppm)
$d_p$	Diámetro de partícula (m)
$D_s$	Difusividad de la sacarosa ( $m^2/s$ )
$D_{s,eff}$	Difusividad efectiva de la sacarosa en el interior de la esfera de alginato ( $m^2/s$ )
EDX	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
ESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray (siglas en inglés)
F	Velocidad de agregación de nanopartículas ( $N_{part} \cdot m^3 \cdot s^{-1}$ )
FC	Capital fijo
FDA	Food and Drug Administration (agencia de EE.UU.)
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (siglas en inglés)
Gz	Número adimensional de Graetz
H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
I	Intensidad reflejada
$I_0$	Intensidad de luz incidente
$I_{corr}$	Intensidad de luz corregida
ICP-MS	Espectrometría de masas acoplada a inducción por plasma
k	Parámetro de geometría de la ecuación Kornsmeyer-Peppas
K	Constante óptica
$K_{agg1}$	Constante de Agregación ( $s^{-1}$ )



$K_{agg2}$	Constante de Desagregación ( $s^{-1}$ )
kat	Catal (masa de enzima que cataliza $1 \text{ mol} \cdot s^{-1}$ )
$k_b$	Constante de Boltzmann (J/K)
$K_{cat(H)}$	Constante catalítica de la hidrólisis (kat)
$K_{cat(P)}$	Constante catalítica de la polimerización (kat)
$K_f$	Coefficiente transferencia de materia líquido-sólido ( $m \cdot s^{-1}$ )
$K_i$	Constante de inhibición cinética ( $g \cdot L^{-1}$ )
$K_{La}$	Coefficiente global de transferencia de materia en el líquido
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten ( $mol \cdot L^{-1}$ )
$K_{M(H)}$	Constante de Michaelis-Menten para la hidrólisis ( $g \cdot L^{-1}$ )
$K_{M(P)}$	Constante de Michaelis-Menten para polimerización ( $g \cdot L^{-1}$ )
$k_r$	Constante de reacción de orden uno ( $s^{-1}$ )
$K_s$	Constante de uso de sustrato ( $g \cdot L^{-1}$ )
$L_{ch}$	Longitud promedio del canal (m)
m	Índice de refracción del medio
MALDI-	Ionización y Desorción con Láser asistido por matriz –
TOF	Tiempo de vuelo (siglás en inglés)
$M_{in}$	Masa de nanopartículas dentro del gel ( $\mu g$ )
$M_{out}$	Masa de nanopartículas fuera del gel ( $\mu g$ )
$m_p$	Coefficiente de mantenimiento ( $g \text{ P} / g \text{ X} \cdot h$ )
$M_{tot}$	Masa de nanopartículas totales ( $\mu g$ )
mV	Milivoltio
MW	Peso molecular (siglás en inglés)
n	Número de dianas
N	Número total de muestras tomadas
NE	Número de experimentos realizados
$NM_{ij}$	Número de medidas de la variable j en el experimento i
$N_{NPs}$	Número de nanopartículas
$NV_i$	Número de variables en cada experimento i
$\emptyset$	Módulo de Thiele
$O_i$	Valor observado de la medida i
p	Parámetro de difusión de la ecuación Kornsmeyer-Peppas
P	Producto, concentración ( $g \cdot L^{-1}$ )
$P(\theta)$	Dependencia angular de la intensidad de dispersión

PBS	Fosfato buffer salino
PF	Polifruetosa
pNIPA	N-isopropil acrilamida
ppm	Partes por mill3n ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
PSE	Process Systems Engineering (ingeniería de procesos)
Q	Caudal de operaci3n ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ )
R	Distancia entre el punto de observaci3n y la partícula (m)
r	Eje radial
$r^*$	Radio adimensional (m/m)
$r_{\text{Av}}$	Radio de avance (m)
$\text{Re}_{\text{ch}}$	Número de Reynolds del canal (m)
$\text{Re}_p$	Número de Reynolds de la partícula
$r_{\text{H}}$	Radio hidrodinámico de la partícula (m)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)
$R_p$	Tasa de obtenci3n de producto ( $\text{mg P/mg X}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$r_p$	Radio de partícula (m)
$r_w$	Volumen del pocillo ( $\text{cm}^3$ )
$R_\theta$	Relaci3n de Rayleigh
S	Concentraci3n de Sustrato ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Sc	Número adimensional de Schmidt
SEC-GPC	Cromatografía de exclusi3n por tamaño – cromatografía de permeaci3n en gel (siglas en inglés)
SEM	Microscopía electr3nica de barrido (siglas en inglés)
Sh	Número adimensional de Sherwood
SLS	Dispersi3n estática de luz (siglas en inglés)
$S_v$	Supervivencia (%)
T	Temperatura (K)
t	Tiempo
TEM	Microscopía electr3nica de transmisi3n (siglas en inglés)
TGA	Análisis termo-gravimétrico (siglas en inglés)
$\text{TNF}\alpha$	Factor de necrosis tumoral
U	Unidad de actividad enzimática ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
V	Volumen de la nanopartícula
$V_{\text{max}}$	Velocidad máxima de reacci3n ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )

$v_r$	Velocidad de liberación / release ( $\text{ppm}\cdot\text{s}^{-1}$ )
WR	Valor ponderado de los residuales
$x$	Biomasa, concentración ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
XRD	Difracción de rayos X
$z$	Eje axial
$z_{ijk}$	Valor predicho de la variable $j$ en el experimento $i$
$\tilde{z}_{ijk}$	Valor medido de la variable $j$ en el experimento $i$
$\beta_{xp}$	Coefficiente de relación biomasa-producto ( $\text{g P/g X}$ )
$\varepsilon$	Porosidad
$\eta_e$	Factor de eficacia externo
$\eta_i$	Factor de eficacia interno
$\theta$	Ángulo entre luz reflejada y luz emitida
$\Theta$	Conjunto de parámetros del modelo a ser estimado
$\lambda$	Longitud de onda de la luz
$\mu$	Tasa específica de crecimiento ( $\text{tiempo}^{-1}$ )
$\mu_r$	Viscosidad del fluido ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\mu_{\max}$	Máxima tasa de crecimiento ( $\text{tiempo}^{-1}$ )
$\rho$	Densidad ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )
$\rho_{\text{gel}}$	Densidad del gel ( $\text{kg/m}^3$ )
$\sigma^2_i$	Desviación estándar de la medida $i$
$\sigma^2_{ijk}$	Varianza de la $k$ -medida de la variable $j$ en el experimento $i$
$\tau$	Tortuosidad ( $\text{m/m}$ )
$\Phi$	Probabilidad de predicción del modelo
$\chi^2$	Chi-cuadrado
$\omega$	Coefficiente de envenenamiento ( $\text{mg enzima/ mg PF}$ )



## RESUMEN

---

La Medicina ha tratado en los últimos años de ayudarse de otras disciplinas como la Ingeniería Química, la Genética o la Física para enfrentarse a los retos sanitarios que se plantean en el siglo XXI. Concretamente, entre las líneas de colaboración se encuentra la nanomedicina, la cual, mediante el trabajo a escala nanométrica, genera beneficios para los tratamientos de diferentes patologías. La nanomedicina camina de la mano de la biotecnología, que trata de obtener productos desde diferentes seres vivos que sean de utilidad para los seres humanos.

Entre los diferentes productos biotecnológicos, requieren especial atención los biopolímeros, que son producidos por microorganismos y poseen características especiales, que los distinguen de los tradicionales polímeros inorgánicos, como su biocompatibilidad o biodegradabilidad, haciéndolos muy adecuados para usos diferentes, en medicina o en alimentación. Los polímeros tradicionales, basados en hexosas, como el alginato o el quitosano, han sido muy usados para diferentes fines, y actualmente se buscan alternativas, con otros polímeros que sean capaces de mejorar algunas propiedades, ofreciendo mejores resultados en el mercado.

En esta tesis doctoral se presentan diferentes estrategias biotecnológicas para la producción de un polímero basado en residuos de fructosa, conocido como levan, que es capaz de formar

nanopartículas estables y tamaño en el rango de 90 a 400 nm (según las condiciones de síntesis), que presentan como potenciales aplicaciones en el campo de la biomedicina. Además, es fácilmente modificable, es decir, pueden realizarse transformaciones químicas en su superficie que mejoren su biodisponibilidad o su especificidad.

El polímero levan ha sido producido tradicionalmente desde bacterias, donde las especies *Zymomonas mobilis* y *Bacillus subtilis* han sido las más utilizadas. Las bacterias producen el polímero desde la sacarosa, utilizando una enzima llamada levan-sacarasa, que es capaz de hidrolizar el disacárido y polimerizar la fructosa para formar el polímero. A pesar de conocerse la estructura cristalina de esta enzima, no se había realizado ningún estudio pormenorizado analizando las diferentes secuencias entre los microorganismos que la tienen presente en su proteoma, y estudiando las posibles regiones consenso, así como posibles péptidos señal. Por esta razón, esta tesis doctoral aborda un estudio bioinformático de esta enzima, comparando más de 100 secuencias diferentes, donde se pudo identificar el péptido-señal que es responsable de la secreción de esta enzima al exterior celular (espacio periplásmico o pared de péptidoglicano), así como varias regiones consenso, que contienen aminoácidos fundamentales para la catálisis. Del alineamiento múltiple de secuencias se pudieron establecer relaciones filogenéticas, y agrupar a las bacterias productoras en ocho familias, dependiendo de la homología de sus secuencias proteicas.

A pesar de existir en la bibliografía numerosos trabajos sobre este polímero, nunca se ha caracterizado de forma completa, ni se ha

estudiado su cinética de producción. De igual forma, no se ha abordado un estudio comparativo de sus propiedades en función del método de producción. El polímero puede producirse de forma tradicional, por fermentación microbiana, o puede hacerse mediante un sistema libre de células, donde solamente se emplea la enzima purificada desde el microorganismo. Para la producción microbiana, se tomaron dos especies que presentaban la enzima, pero que no habían sido estudiadas en la bibliografía previamente para la producción de levan: *Bacillus atrophaeus* como ejemplo de Bacteria Gram positiva, y *Acinetobacter nectaris* como ejemplo de Bacteria Gram negativa. Para la producción de forma enzimática libre, se empleó la enzima purificada comercial, obtenida desde *Bacillus subtilis*.

Mediante el cultivo líquido de estas bacterias se estudió su crecimiento, así como la producción del polímero asociada, determinando las cinéticas de crecimiento microbiano y de producción de levan, así como los valores estequiométricos de la reacción para ambos casos. Los resultados mostraron que se ajusta a una cinética de inhibición por sustrato y por intermediario (glucosa), y la producción de polímero sigue un modelo de Leudeking-Piret, donde la síntesis del polímero va acoplada al crecimiento microbiano.

El polímero obtenido fue caracterizado a nivel físico-químico para asegurar la naturaleza del mismo, y se procedió a la preparación de nanopartículas desde éste gracias a su reorganización en agua. Se obtuvieron nanopartículas de 130 nm de diámetro, con carga superficial próxima a 0 mV, pero permanecían estables durante al menos los

primeros 15 días después de ser reorganizadas. Las mismas caracterizaciones fueron realizadas con el polímero obtenido de forma enzimática, observándose un tamaño medio de partícula ligeramente inferior (90 nm), con la misma carga superficial (próxima a 0 mV) y estables durante al menos los primeros quince días.

Tanto el polímero obtenido por vía microbiana como el polímero obtenido por vía enzimática, fueron caracterizados por microscopía electrónica donde se observó que presentaban forma esférica y una adecuada distribución en ambos tipos de producciones. De igual forma, se estudió el proceso de auto-ensamblado, analizando el entorno hidrofóbico mediante espectrofotometría de fluorescencia, pudiéndose determinar la Concentración de agregación crítica, cuyo valor fue 0.07 mg/mL para el caso de las nanopartículas obtenidas de forma microbiana y de 0.20 mg/mL para las nanopartículas obtenidas de forma enzimática. Además de lo anterior, se analizó su peso molecular empleando dos técnicas diferentes que certificaron la existencia de este proceso de auto-ensamblado, resultando un peso molecular de aproximadamente el doble en el polímero obtenido de forma microbiana. En ambas situaciones, se comprobó su baja capacidad para retener proteínas de forma no-específica, lo que supone una ventaja para no ser atrapadas por el sistema inmunitario, siendo el levan producido de forma enzimática el que menos adsorbe proteínas de forma inespecífica (menos del 1% en peso).

En el caso de la producción microbiana se desarrollaron estrategias para reducir costes de producción, tales como emplear



residuos de la industria alimentaria como fuente de nitrógeno para el crecimiento de las bacterias. Esta estrategia resultó efectiva para el crecimiento de *B. atrophaeus*, consiguiéndose una reducción del 10% en el coste del medio de cultivo.

En el caso de la producción enzimática, se estudió el efecto de numerosos factores en la producción del polímero, que pudieran mejorar la eficiencia del proceso. Los más importantes estudiados fueron la concentración de sustrato, la concentración de intermediarios o de otros azúcares, la temperatura, la proporción enzima-sustrato, la presencia de elicitores como ATP o manganeso, o incluso, la posibilidad de utilizar sustratos alternativos como la rafinosa. De cada una de estas alternativas se pudo estudiar la evolución en la concentración de nanopartículas durante la síntesis, así como su tamaño; observándose diferencias significativas que podrían ser utilizadas para conseguir nanopartículas “a la carta”.

Para un mayor control de la síntesis enzimática, y con el objetivo de comprender mejor el proceso, los fenómenos de síntesis y auto-ensamblado fueron modelados utilizando ecuaciones diferenciales para proponer un modelo que englobara ambos fenómenos. Para la determinación de los parámetros se realizó una estimación hessiana, obteniendo, con elevada significación estadística, los principales valores que se encargan de gobernar el proceso. Con esos valores es posible ejecutar simulaciones bajo diferentes condiciones experimentales, que permiten predecir el comportamiento del sistema, así como optimizar para mejorar la producción de polímero y el ensamblado de partículas.

A pesar de las ventajas que ofrece el trabajo con sistemas enzimáticos en lugar de microbianos, esta posibilidad no es completamente explotada debido a que la purificación de la enzima supone un elevado coste, que reduce considerablemente la viabilidad económica del proceso. Por esta razón, se estudiaron dos alternativas para la inmovilización de la enzima levan-sacarasa, de tal forma que pueda ser reutilizada para varios ciclos de reacción. Concretamente, se trabajó la inmovilización en un reactor de lecho fijo con esferas de alginato, donde la enzima es retenida dentro de las mismas, y en un reactor monolítico, donde la enzima es unida al soporte por un brazo espaciador que contiene un cobre terminal que retiene las enzimas por sus histidinas superficiales.

En primer lugar, se cuantificó la capacidad de retención de la enzima en ambos soportes, alcanzándose valores de 80% para el caso de las esferas de alginato y del 95% para el reactor monolítico. Posteriormente se estudió el efecto de la inmovilización en la reacción enzimática, cuantificando los rendimientos de producción, así como las condiciones de operación de los reactores (caudal, porosidad, longitud del lecho, etc.). Los resultados mostraron que era necesario un elevado tiempo de residencia en el reactor para conseguir que se realizara el intercambio de moléculas entre las fases (líquido-sólido), por lo que los caudales de trabajo deberían ser muy bajos. De igual modo, se demostró que, a esos flujos máscicos, el fenómeno de la pérdida de carga puede considerarse despreciable. Las nanopartículas obtenidas desde el polímero producido por este sistema también fueron caracterizadas, observándose diferencias importantes: el tamaño de las

producidas desde el lecho fijo se sitúa en 230 nm, mientras que desde el reactor monolítico se mantienen en 150 nm.

Con todos los valores, se formuló un modelo de transferencia de materia, que explicase las diferencias entre los reactores homogéneos y heterogéneos mediante correlaciones experimentales y números adimensionales. Estos resultados muestran que el reactor monolítico presenta una menor resistencia interna al transporte de materia ( $0.031 \text{ s}^{-1}$ )<sup>1)</sup> que el reactor de lecho fijo empaquetado ( $0.301 \text{ s}^{-1}$ ).

Dado que la inmovilización debe aportar una reducción de costes, se estudió la viabilidad tecnológica y económica de plantas de producción del polímero utilizando ambas estrategias. Los resultados mostraron, que, en ambos casos, el coste de producción es semejante (6000€/kg), y muy inferior al coste que supondría la producción desde un reactor enzimático homogéneo.

Para finalizar la tesis doctoral, se presentan tres potenciales aplicaciones de este polímero, para intentar solventar algunos de los retos de la biomedicina en los próximos años: tratamiento de tumores, control de infecciones bacterianas, prevención de infecciones en prótesis.

Para el tratamiento de tumores, las nanopartículas obtenidas por vía enzimática y vía microbiana fueron usadas como vehículos para transportar un fármaco quimioterápico (5-fluorouracilo) y se estudió su

liberación controlada y efecto en células tumorales de colon y mama. Las nanopartículas presentaban una capacidad de carga del 0.65%, y los ensayos *in vitro* demostraron la eficiencia de este tratamiento en ambas líneas celulares. De igual forma, se probó la ausencia de toxicidad de las nanopartículas, al ser administradas sin carga a las células.

Con el objetivo de controlar infecciones bacterianas superficiales, se diseñó un gel basado en alginato que contenía nanopartículas de plata y polímero levan. Estas nanopartículas son capaces de ser liberadas de forma controlada sobre la superficie con infección bacteriana, y detener el crecimiento de las bacterias. Se estudiaron diferentes dosis y con diferentes microorganismos, consiguiendo reducir la supervivencia hasta un 20% en algunos de los casos, en las primeras 24 horas. Con los datos obtenidos se formuló un modelo global que evaluaba la difusión de las partículas en el gel, su liberación, así como la supervivencia de los organismos que vivían fuera de él.

Para la prevención de infecciones en prótesis, se utilizó el polímero levan como recubrimiento para impedir la bioadhesión de patógenos en prótesis de titanio-aluminio-vanadio. El recubrimiento se caracterizó por análisis químico, por microscopía y por difracción de Rayos X. La eficiencia de dicho recubrimiento se evaluó al ser expuesto a cultivos de la cepa *Staphylococcus*, y posteriormente cultivadas en agar sangre, haciendo una cuantificación de las colonias producidas. Los resultados obtenidos muestran un recubrimiento

prácticamente uniforme, con una distribución cristalina del polímero. Los resultados microbiológicos muestran que no existe crecimiento de colonias en las prótesis recubiertas mientras que sí existe en el caso de los controles. Estos resultados sugieren una vía de profundización para conseguir prótesis más biocompatibles y que eviten el rechazo o la infección en los pacientes.



# ABSTRACT

---

Medicine has looked to collaborate in other fields such as Chemical Engineering, Genetics and Physics in order to face on the health challenges that should be solved in 21<sup>st</sup> century. Within the fields of collaboration is situated the Nano-medicine, which generates benefits for many treatments of different illnesses, by working on a nanoscale. Nanomedicine works hand in hand with Biotechnology, a subject area that tries to obtain products from living beings to be used by humans.

Unlike other products, biopolymers may require special attention. They are produced by microorganisms and they have special properties such as biocompatibility and biodegradability, that distinguish them from the traditional inorganic polymers. These properties make them really useful for different applications in medicine or food science. The traditional polymers based on hexoses, such as alginate or chitosan, have been widely used for different purposes. Nowadays, new alternatives are being combined with other polymers that are able to improve some properties, offering better results in the market.

In this PhD thesis it will be presenting different biotechnological strategies to produce a biopolymer based on fructose residues (known as levan), which is able to form stable nanoparticles in

a size in the range of 90 to 400 nm (depending on synthesis conditions). These particles present potential applications in the field of biomedicine. Moreover, it is easily modifiable. In other words, it is possible to carry out some chemical transformations in its surface that improve its bioavailability or specificity.

Levan biopolymer has been produced traditionally from bacteria, where *Zymomonas mobilis* and *Bacillus subtilis* have been the genera most used. Bacteria produce the polymer from sucrose by using the enzyme levan-sucrose, which is able to hydrolyze the disaccharide and to polymerize the fructose to form the polymer.

Despite knowing the crystal structure of this enzyme, a study has not been reported which analyzes the different protein sequences among the microorganisms that have this enzyme in their proteome. Nor has there been a study that has paid attention to possible consensus sequence, as well as possible signal peptides. For these reasons, this thesis presents a bioinformatics study of the enzyme levan-sucrase, through the comparison of more than 100 different sequences where it was possible to identify the presence of a signal peptide which is responsible of the enzyme extracellular secretion (to periplasmic space or to peptidoglycan wall). Furthermore, the study has reported the presence of some consensus sequences that presents essential aminoacids for catalysis. From the multiple sequence alignment, it was possible to establish phylogenetic links, and to cluster the producer bacteria in eight families, depending on the homology of protein sequence.



Despite having many works in the literature related with this polymer, it has never been characterized in a complete way, its kinetics production has never been studied. In a similar way, it has never approached a comparative study of their properties attending to the production method. The polymer can be produced by the traditional method (microbial fermentation) or by a cell-free system, where only the enzyme involved is used (purified from microorganism). For the microbial production, two strains, that have not been studied before for levan production, were selected: *Bacillus atrophaeus* as example of Gram positive bacteria and *Acinetobacter nectaris* as example of Gram negative bacteria. For the cell-free production, a commercial enzyme (levansucrase) purified from *Bacillus subtilis* was used.

The growth of bacteria and polymer production was studied in a liquid culture. The results allow to determine growth kinetics and product formation kinetics, as well as the stequiometric coefficients for both types of bacteria. The results showed that growth is controlled by substrate-inhibition kinetics where the intermediate (glucose) acts as another inhibitor. Polymer production follows the classical model proposed by Leudeking-Piret, where polymer synthesis is parallel to microbial growth.

The polymer obtained was characterized at a physicochemical level in order to assure the nature of the product, and the nanoparticles were produced from it by putting them in water for their self-assembly.

The nanoparticles obtained have an average size of 130 nm with a surface charge around 0 mV and they remain stable at least the first 15 days. The same characterizations were done with the polymer obtained from enzymatic way. The size of particle is slightly lower (90 nm) with the same surface charge (around 0 mV) and stable at least the first 15 days.

The nanoparticles obtained from both types of polymers (by bacteria or by cell-free system) were characterized by electron microscopy where it was observed that they present spherical shape and an adequate distribution in both types of productions. In a similar way, the self-assembly process was studied by analyzing the hydrophobic environment with fluorescence microscopy. This technique allows one to determine the critical aggregation concentration, whose value was 0.07 mg/mL for nanoparticles of microbial origin and 0.20 mg/mL for nanoparticles of cell-free origin. In addition, the molecular weight of the polymer was analyzed by using two different techniques that certify the existence of a self-assembly process. The results obtained proved that molecular weight of the polymer from microbial systems is around double the cell-free one. Both polymers showed low capacity to absorb proteins non-specifically, which is an advantage in order not to be recognized by immune system. Levan from cell-free system presents the lowest value of this non-specific adsorption (less than 1%).

For the case of microbial production, different strategies were carried out in order to reduce the production costs, such as using wastes from food industry as nitrogen source for bacterial growth. This

strategy was effective for *B. atrophaeus* growth reaching a reduction of 10% in culture medium cost.

For the case of enzymatic production, the effect of many factors involved in polymer production was studied. The concentration of substrate was studied along with, the concentration of reaction intermediates, the presence of other sugars in the reaction, the temperature, the ratio enzyme-substrate, the presence of elicitors such as ATP or manganese, and the possibility of use alternative sources such as raffinose. For each experiment it was studied the effect on nanoparticles diameter and its role on polymer synthesis (nanoparticles production). Some differences are observed and therefore, these are strategies to obtain nanoparticles *à la carte*.

In order to control the process and a better understanding of it, the phenomena of synthesis and self-assembly were modeled by using differential equations in order to formulate a model that explains both phenomena. For calculating the parameters of the model, hessian estimation was performed. The values that control the process were obtained with high statistical significance, and they allow executing some simulations under different experimental conditions that predict the behavior of the system as well as an optimization of the process to get better production and assembly of the particles.

Despite the advantages of working with cell-free systems instead of microbial ones, this possibility has not been widely studied

because of the high cost of enzyme purification (reducing the economic viability of the process). For that reason, two alternatives were studied to immobilize the enzyme levansucrase to be re-used several times. Particularly, it was immobilized in a packed bed reactor (alginate beads) where the enzyme is entrapped inside the beads and in a monolithic reactor where the enzyme is linked by a spacer arm which has a copper ion that forms a bond with the histidine residues of the enzyme.

Firstly, the amount of enzyme immobilized was quantified in both systems, reaching values of 80% for packed bed reactor and 95% for monolithic reactor. After that, the effect of immobilization process was studied by quantifying the production yield as well as the operation conditions (flow rate, porosity, and reactor length). The results showed that more time of residence inside the reactor is needed to have the mass transfer between the phases (liquid and solid). For that reason, the flow rates should be low. Furthermore, at those values of flow rate, it was proved that head loss can be negligible. The nanoparticles produced from these reactors were characterized as well, and several differences were observed: the nanoparticles produced by packed bed reactor have an average diameter of 230 nm and the ones obtained from monolithic reactor have an average diameter of 150 nm.

A mass transfer model was proposed by using the experimental data. This model is able to explain the differences among homogeneous reactors and heterogeneous reactors by empirical correlations and dimensionless numbers. The results of mass transfer modeling showed

that monolithic reactor has less internal resistance to mass transfer ( $0.031\text{ s}^{-1}$ ) than packed bed reactor ( $0.301\text{ s}^{-1}$ ).

The main objective of this immobilization is a reduction in production costs. Therefore, the viability (technical and economical) of polymer production was studied for both types of reactors. The results showed that, for both cases, the production cost is similar (around 6,000 €/kg) and much lower than for a homogenous reactor.

To complete the thesis, three potential applications were explored in order to solve some of the biomedicine challenges for next years: tumor treatment, bacterial infection control, and the prevention of infections in orthopedics.

For tumor treatment, nanoparticles obtained from bacteria and from cell-free systems were evaluated as carriers for the entrapment of a chemotherapeutic drug (5-fluorouracil). Its controlled release and therapeutic action was studied in colorectal and breast cancer cell lines. The nanoparticles have a loading capacity around 0.65% and in vitro assays showed the efficiency of this treatment in both cell lines. In a similar way, the nanoparticles toxicity was evaluated by the administration of them without the drug. The results showed the absence of toxicity of drug-free nanoparticles.

A gel based alginate was designed with the purpose of controlling bacterial infections. This gel contains nanoparticles formed by levan and silver, where the metal is responsible to control microbial propagation. These nanoparticles are able to be released from the gel in a controlled way to the surface with bacterial infection and stop the growth of them. Different doses and bacteria have shown to reach a reduction in survival less than 20% at the first 24 hours. With the data obtained, a global model was proposed to explain the diffusion of particles inside the gel, its release and the survival of microorganisms exposed to the gel.

The last application is related with the prevention of infection in prosthesis. For that purpose, the biopolymer was used as coating to prevent the adhesion of some pathogens in prosthesis composed by titanium, aluminum and vanadium. This coating was characterized by chemical analysis, microscopy and X-ray diffraction. The efficiency of this coating was evaluated by being exposed to a culture of the bacteria *Staphylococcus*, and further cultured in blood agar (quantifying the colonies in the plate). The results showed that the coating is uniform, with a crystalline distribution of the polymer. The microbiology results showed that there were not colonies in the plates with prosthesis coated while there were many colonies in the control ones. These results suggest the opening of a new way to get prosthesis more biocompatible to prevent rejection or infection.

# Capítulo 1

---

## Introducción





## **1. LA BIOTECNOLOGÍA Y EL RETO SANITARIO ACTUAL**

A pesar de que la biotecnología parece una ciencia de reciente creación, sus orígenes pueden remontarse hasta los inicios de los asentamientos humanos, con la estabilización de las poblaciones (en el Neolítico, unos 10.000 años a.C.), y, por tanto, la explotación de la tierra y sus recursos mediante la práctica de la ganadería y la agricultura. Los seres humanos realizaban prácticas biotecnológicas, aunque desconocieran los mecanismos que subyacían a dichas actuaciones. Quizás la fermentación más antigua reportada corresponde a la producción de pan y cerveza, del que se tienen registros hacia el siglo VII a.C. en Mesopotamia. Otra práctica habitual, la alternancia de cultivos, fue incorporada por los griegos, donde existen registros de Teofrasto (300 a.C.), que sugería la rotación del cultivo de frijol porque dejaba “magia” en el suelo para sucesivos cultivos. Muchos siglos después se descubrió que el frijol facilitaba el crecimiento de microorganismos captadores de nitrógeno atmosférico.

No fue hasta los siglos XVIII y XIX cuando se produjeron los avances más importantes en microbiología que han contribuido a generar una biotecnología más específica, basada más en el conocimiento teórico que en los usos y costumbres. A este respecto, son destacables durante este período el descubrimiento de la vacunación por Edward Jenner en 1798, el desarrollo de la esterilización (Nicholas Appert, 1809 y Louis Pasteur, 1860), o el uso de fenol para evitar infecciones en cirugía (Joseph Lister, 1865). Sin embargo, el gran avance se produjo a finales de este siglo, con el desarrollo de la teoría del origen de las especies (Darwin, 1859), y las

leyes de la herencia (Mendel, 1865), que sientan las bases de la heredabilidad de los caracteres, y se comienza a trabajar en la identificación de la molécula de ADN, que no fue identificada, como molécula de la herencia hasta 1944 (Avery, MacLeod, McCarty).

Los inicios del siglo XX fueron el momento del avance de la biotecnología en el sector industrial. La primera guerra mundial supuso el inicio de las fermentaciones industriales, con la producción de acetona desde almidón de maíz gracias a *Clostridium acetobutylicum*, o la producción de glicerina para posteriormente producir nitroglicerina. En 1928, Alexander Fleming descubre la penicilina, y años más tarde se realiza su producción industrial para frenar el control de las infecciones en Europa.

Por otra parte, estas primeras décadas de siglo también supusieron un momento de revolución en el campo de la biotecnología vegetal. En 1934 se definieron las condiciones para poder cultivar tejidos vegetales gracias al descubrimiento de las fitohormonas y vitaminas (Gautheret, Nobécourt y White). Esto va asociado a la llamada “Revolución Verde”, promovida por Norman Bourlaug, donde mediante técnicas clásicas como la hibridación (sin ingeniería genética), se mejoró el rendimiento de los cultivos y surgieron negocios relacionados con la venta de semillas.

Sin ninguna duda, la revolución biotecnológica moderna comienza con la aparición de la genética molecular e ingeniería genética. Concretamente, en 1957 se formula el Dogma central de la Biología Molecular, que asocia la transcripción del ADN al ARN, y la traducción de éste a proteínas. Este descubrimiento potencia la investigación con

ácidos nucleicos hasta que Arber, Nathans y Smith descubren en 1970 las enzimas de restricción, que son las que permiten realizar ingeniería genética con la edición de secuencias de ácidos nucleicos. El descubrimiento de estas enzimas genera un amplio desarrollo de plásmidos y vectores para poder expresar genes exógenos en otras bacterias, y se multiplican las aplicaciones industriales.

A raíz de esto, se comienzan a fundar las primeras empresas de base biotecnológica, siendo Genentech, en Estados Unidos de América, en 1976 la primera. Toda la revolución genética alcanza su mayor esplendor al ser publicado el Genoma Humano en el año 2001. Las posibilidades abiertas por la ingeniería genética son inmensas, y se han visto eficaces fundamentalmente en tres campos de actuación: agricultura, salud, e industria manufacturera. Una reciente aportación, el sistema de edición de genes CRISPR-Cas9, supone una nueva revolución y un incentivo para la ingeniería genética, y el desarrollo de nuevos procesos y productos.

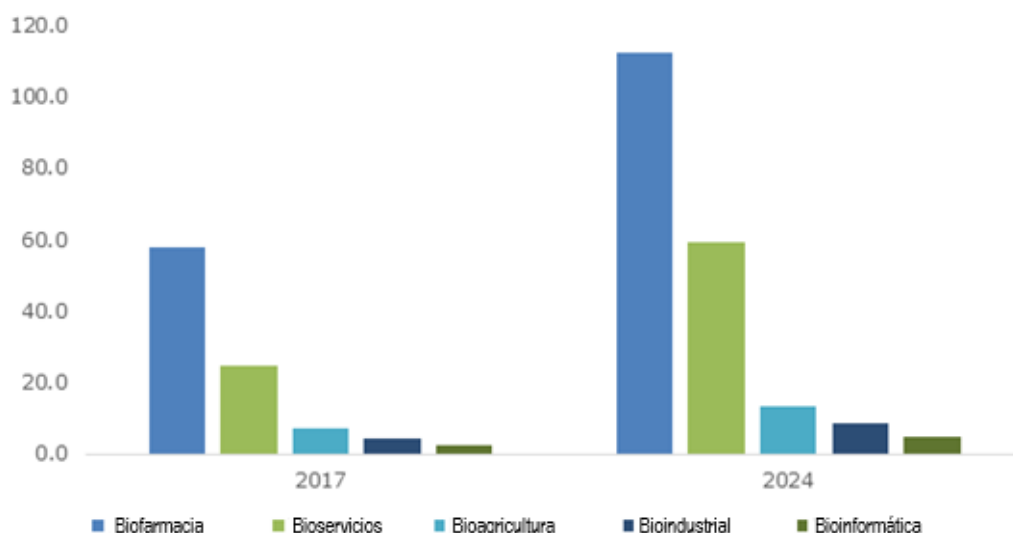
En agricultura aparecen nuevas semillas, que tratan de solventar algunos problemas existentes respecto a los cultivos tradicionales, como es el caso del maíz BT (evitando pérdidas de cultivo por infección de *Bacillus thuringiensis*), el arroz dorado (enriquecido en vitamina A para regiones en vías de desarrollo) o plantas resistentes a sequía, heladas o inundaciones.

En la industria manufacturera se consiguen avances importantes en los rendimientos de producción, al modificar los microorganismos productores, y se consiguen generar péptidos y proteínas de elevado interés como la insulina o anticuerpos monoclonales desde bacterias o

virus. La industria biotecnología también trabaja en la obtención de otras sustancias como vitaminas, polímeros, metabolitos secundarios, que tienen elevado valor añadido, y son cada día más demandados por la sociedad (Erikson, 2017).

En la salud, la llegada de la biotecnología ha supuesto una revolución, con la aparición, gracias a ella, de los fármacos biológicos, como los interferones o la eritropoyetina; y más recientemente con la irrupción de la terapia génica. Ésta última, aún por desarrollar, supone uno de los retos más importantes de la salud para el siglo XXI pues trata de enfrentar las enfermedades desde su origen primero, modificando la genética del organismo, y evitando la expresión proteica. El desarrollo de técnicas para el estudio de los cromosomas y del ADN permite seguir avanzando en esta línea tan prometedora (Dunbar et al., 2018).

En la figura 1.1 se muestra el valor del mercado (en billones de dólares) de la biotecnología en Estados Unidos de América en el año 2017, y la estimación de dicho mercado en el año 2024.



**Figura 1.1: Mercado de la biotecnología por secciones en Estados Unidos de América en 2017 y proyección para el año 2024. Fuente: Global Market Insights.**

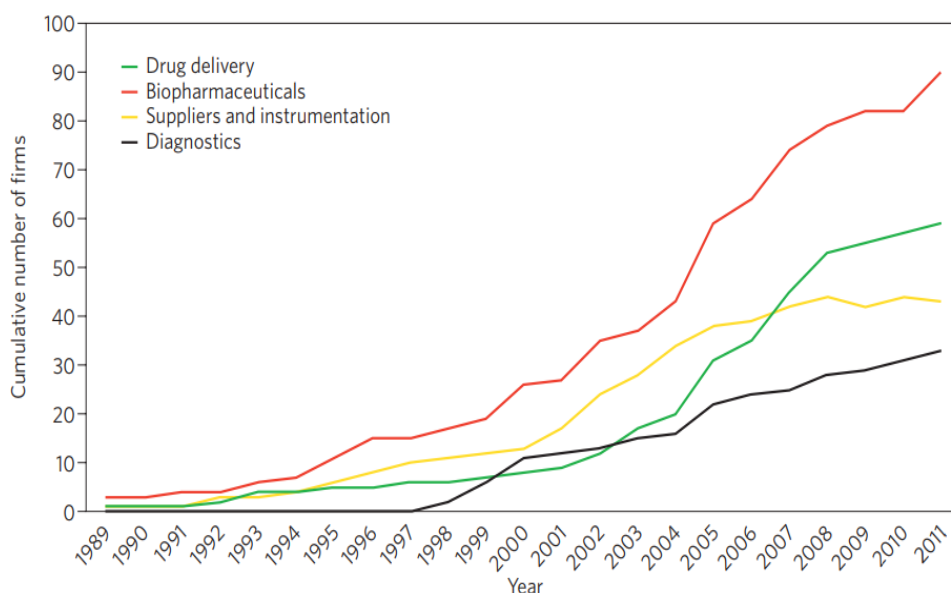
Como se puede observar, el campo de la salud o farmacia seguirá siendo el dominante, casi duplicando su valor de mercado en los próximos años (Biotechnology market Size by Application, 2017).

Es en el campo de la salud, en el que nos centraremos en esta tesis doctoral, **estudiando las aplicaciones de un polímero, obtenido de forma biotecnológica** a partir de microorganismos o de sus componentes. La mejora de la salud ha sido una máxima desde la aparición del hombre, pero en el siglo XXI toma un carácter diferente en la forma de abordarse, si se compara con la tendencia tradicional de este mercado. El desarrollo de compuestos tradicionales para hacer frente a enfermedades se encuentra estancado, y siguiendo las recomendaciones de la Comisión Europea (Instructions EU Framework - Horizon 2020), los avances científicos deben enfocarse a las siguientes áreas:

- a) Mejora de las técnicas para la detección y diagnóstico, así como para la prevención. Técnicas basadas en el genoma, epigenoma, proteoma o metaboloma.
- b) Medicina personalizada, tratando de buscar tratamientos concretos en función de las condiciones del individuo.
- c) Desarrollo de modelos mecanísticos que permitan predecir el desarrollo de enfermedades y de las respuestas a ellas.
- d) Mejora de la seguridad de los datos de los pacientes, caminando hacia una medicina más informatizada.

Relacionado con la biotecnología, y aplicado al campo de la salud, la nanotecnología ha contribuido a este nuevo desarrollo de la medicina en los últimos años, con la expansión de un nuevo campo conocido como nanobiotecnología, que aborda los retos a, b, y c presentados anteriormente.

El desarrollo e investigación en nanotecnología en los últimos 15 años ha sido muy grande, con una creciente incorporación de empresas al sector de la nanobiotecnología, concretamente, a sus diferentes aplicaciones en salud. En muchos casos, las nuevas compañías que realizan esta investigación y desarrollo de producto surgen de fusiones o alianzas entre multinacionales que tenían su modelo de negocio tradicional en la industria química, farmacéutica o electrónica. Muchas de ellas han incorporado esta sección de mercado al adsorber a pequeñas compañías eminentemente nanotecnológicas. En la figura 1.2 se observa la evolución en el número de compañías que generan productos de nanobiotecnología relacionados con la salud.



**Figura 1.2: Evolución de la industria de la nanobiotecnología en salud, por sub-sectores, desde 1989 hasta 2011. Fuente: Maine et al. (2014).**

Como puede observarse, el mercado de fármacos biotecnológicos (*biopharmaceuticals*), es decir, terapias basadas en péptidos o proteínas, es el más desarrollado, seguido del sector basado en la liberación controlada de fármacos (*drug delivery*). El comportamiento exponencial que se observa permite predecir que en los próximos años seguirá aumentando considerablemente el número de empresas competidoras en el negocio, que propiciará un mayor desarrollo tecnológico y comercial de los productos (Maine et al., 2014).

Concretamente, dentro del sector de liberación controlada de fármacos, la aplicación más estudiada, y que ha requerido más atención por parte de la comunidad científica es la detección y tratamiento de cáncer. La enfermedad de cáncer se ha definido en los últimos años como la patología del siglo XXI. El número de personas diagnosticadas con algún tipo de cáncer aumenta cada año, con 18.1 millones de nuevos casos

en el año 2018 frente a 14.1 millones que se encontraron en el pasado informe de GLOBOCAN del año 2012. Además, aumenta también el número de muertes anuales causadas por este motivo, que en 2018 alcanzaron las 9.6 millones, mientras que fueron 8.2 millones en el año 2012 (Bray et al., 2018). Esta expansión de la enfermedad requiere de esfuerzos investigadores, que sean capaces de tratar y diagnosticar de forma eficaz, controlando la aparición de nuevos tumores, así como mejorando las expectativas de supervivencia de los pacientes.

Concretamente, el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos, se ha planteado como una mejora sustancial respecto al tratamiento tradicional de esta patología, conocida como quimioterapia. Este tratamiento supone el uso de potentes agentes químicos capaces de detener la proliferación celular, pero con bajo índice terapéutico y elevados efectos adversos debido a una falta de direccionamiento específico, que permita actuar exclusivamente en el órgano diana (Li et al., 2016). La otra gran limitación del tratamiento tradicional con quimioterapia es la acción de las bombas de resistencia a drogas en las células tumorales (MDR, *multi-drug resistance*), que evita que las células sean atacadas por macrófagos o fagocitos (Szakacs et al., 2006).

El uso de sistemas de liberación controlada de fármacos, que permitan un direccionamiento específico, y consigan evitar la barrera de la resistencia a fármacos (MDR) es el objetivo de todos los estudios realizados en este campo. Para conseguirlo, se han estudiado diferentes sistemas de transporte que abarcan desde liposomas, micelas poliméricas, polymersomas, hidrogeles, nanoemulsiones, o nanopartículas poliméricas (Li et al., 2016). Actualmente, hay numerosos tratamientos en ensayos



clínicos con estas formulaciones, conteniendo solamente un fármaco. En los últimos años, la investigación desarrollada ha ido encaminada a trabajar en la co-liberación de dos fármacos diferentes, o un fármaco y un gen, que tengan un efecto sinérgico, y mejoren el tratamiento del tumor diana. Sin embargo, estos sistemas aún se encuentran en fase de estudios preclínicos (Li et al., 2016).

La base química para estos sistemas pueden ser polímeros sintéticos o biopolímeros, con sus ventajas e inconvenientes. A lo largo de la siguiente sección se abordarán los principales componentes que constituyen estos sistemas, así como otros desarrollos con gran potencial médico en las próximas décadas.

## 2. LOS EXOPOLISACÁRIDOS

En los últimos años, la medicina ha conseguido revertir muchas enfermedades que eran consideradas letales en el pasado, y que actualmente son sanadas con una elevada tasa de éxito. Por esta razón, actualmente, el foco de la medicina está también puesto en mejorar la calidad de vida de las personas (Ackernecht, 2016).

En este sentido, los polímeros tienen un papel importante por su versatilidad de aplicaciones potenciales, tales como sistemas de liberación controlada, generación de matrices para ingeniería de tejidos, o medicina regenerativa (Berthiaume et al., 2011). Estos polímeros se pueden clasificar como naturales o sintéticos, pero, en cualquier caso, si quieren ser usados para aplicaciones biomédicas, deben cumplir con una serie de requisitos (Lendlein, 2010):

- Propiedades mecánicas flexibles en función de la aplicación (fuerza, dureza, etc.).
- Biocompatibilidad, es decir, que no resulten tóxicos para el organismo donde van a ser administrados.
- Biodegradabilidad, es decir, que no se acumulen. En el caso de los sistemas de liberación controlada, en esta propiedad debe incluirse la existencia de un adecuado perfil de liberación.
- Propiedades térmicas y de permeabilidad adecuadas.

Los polímeros sintéticos como las poliolefinas, los poliacrilatos, los poliésteres, o las poliamidas se han empleado ya en algunas aplicaciones de biomedicina. Generalmente son los polímeros que presentan las mejores propiedades mecánicas, convirtiéndolos en sustancias de gran

interés industrial. Sin embargo, muchos de ellos presentan el problema de la biodegradación como gran limitación para un mayor uso (Maitz, 2015).

En contraposición, los polímeros naturales son producidos por organismos vivos, y son popularmente conocidos como biopolímeros. Son biomoléculas que juegan un papel importante en el desarrollo y actividad de estos seres vivos, tales como la respuesta inmune, la formación de biofilms o el almacenamiento de energía (Yadav et al., 2015). Estos biopolímeros se pueden clasificar según dos criterios: por su estructura o por su origen sintético.

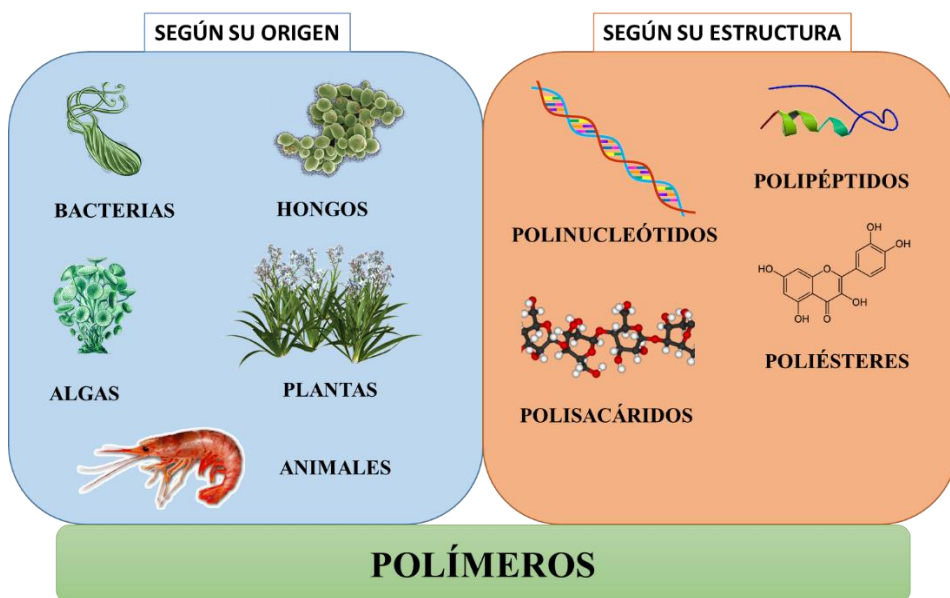
Atendiendo a su estructura, es decir, a la naturaleza del monómero que es polimerizado:

- Polinucleótidos: formados por ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos (ARN o ADN).
- Polipéptidos: formados por aminoácidos, tales como elastina, colágeno, zeína, etc.
- Polisacáridos: formados por azúcares, monosacáridos.
- Polifenoles: formados por la polimerización de compuestos fenólicos tales como la lignina, flavonoides o taninos).
- Poliésteres: polímeros que contienen un grupo éster funcional en su cadena lateral (polihidroxialcanoatos, ácido poliláctico).

Si los clasificamos según su origen sintético, por el organismo productor:

- Producidos por bacterias: son ejemplos el dextrano, gellan, goma xantana, polihidroxialcanoatos, entre otros.
- Producidos por hongos: son ejemplos los glucanos y el pululano.
- Producidos por algas: son destacables el agar o el alginato.
- Producidos por plantas: hay una gran variedad entre la que destacan las pectinas, el almidón o los taninos.
- Producidos por animales: son ejemplos destacados la quitina y el ácido hialurónico.

En la figura 1.3 se muestra un esquema-resumen de las clasificaciones mencionadas anteriormente, atendiendo al origen y estructura de los polímeros.



**Figura 1.3.** Esquema-resumen de las clasificaciones de los diferentes biopolímeros, según su origen (azul) y según su estructura (naranja).

De todos los ejemplos mencionados hasta ahora, toman especial relevancia y aplicación hasta el momento actual el alginato y los

polihidroxicanoatos, que ya se han usado para diversos fines. Sin embargo, es necesaria más investigación en otros biopolímeros para descubrir nuevas propiedades de los mismos, que puedan satisfacer necesidades de la industria que aún están por abordar.

Específicamente, a lo largo de la tesis doctoral nos vamos a centrar en un polímero que es exopolisacárido, formado a partir de unidades de fructosa, producido a partir de varios géneros de bacterias y que aún no se ha estudiado de forma intensiva. Por esta razón, los siguientes párrafos de esta sección versarán sobre la importancia y utilidad de los exopolisacáridos, y más concretamente, los de origen bacteriano.

Los **exopolisacáridos** son polímeros basados en monosacáridos que son secretados al medio extracelular por diferentes organismos (bacterias, hongos y algas). Presentan algunas ventajas destacables:

- Son fácilmente producibles por los microorganismos: las condiciones de cultivo son muy conocidas y las materias primas son baratas.
- Son secretados al medio externo. Esta es posiblemente la propiedad más interesante, pues al no producirse una acumulación intracelular, su recuperación es más sencilla. Supone una reducción de costes en el diseño industrial del proceso.
- Presentan buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, que son factores esenciales para el uso en biomedicina, como se vio anteriormente.
- Presentan propiedades mecánicas adecuadas: buena elasticidad, viscosidad y permeabilidad.

- La mayoría son bastante solubles en agua, y en algunos solventes orgánicos.
- Pueden ser reciclados, dado que pueden servir de alimentación a otros organismos vivos tras su uso (si procediera).

La producción de exopolisacáridos depende del tipo de microorganismo. Según el microorganismo productor (bacteria, hongo o alga) se pueden diferenciar varias vías biosintéticas. En el caso de las bacterias, que es el que nos ocupa, se distinguen 4 vías de producción (Schmid et al., 2015):

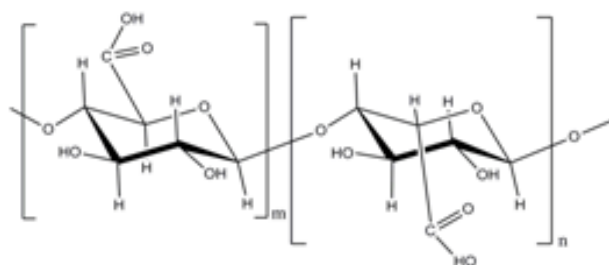
- Ruta biosintética dependiente de Wzx/Wzy
- Ruta biosintética dependiente de centro de unión a ATP
- Ruta biosintética dependiente de una sintasa
- Síntesis extracelular con enzimas

Para el caso del polímero objeto de estudio en esta tesis doctoral, la ruta empleada es la última de las cuatro descritas, la **síntesis extracelular mediada por enzimas**. Esta ruta implica en primer lugar la síntesis de una enzima que lleva en su extremo una región peptídica llamada péptido señal. Este péptido señal es el encargado de guiar la localización subcelular de la proteína (enzima) una vez terminada la traducción en el ribosoma. La proteína es dirigida específicamente a la membrana donde es anclada para comenzar la catálisis. Una mayor síntesis de enzima parece estar relacionada con una acidificación del medio, obteniéndose los mayores rendimientos de producción y secreción de enzima en valores de pH entre 5 y 6 (Srikanth et al., 2015).

Durante las siguientes sub-secciones se describen brevemente los exopolisacáridos más empleados en aplicaciones biomédicas recientemente, desde el punto de vista de su composición y síntesis. En la siguiente sección de este capítulo se mencionarán las diferentes aplicaciones biomédicas de cada uno de ellos, que ya han sido estudiadas en la literatura.

## 2.1. Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico que se encuentra localizado en la pared celular de las algas marrones pero que también es secretado por bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, para la defensa contra patógenos y la formación de biofilms (Boyd y Chakrabarty, 1995). El alginato es un heteropolisacárido formado por la repetición de bloques de D-manurónico y L-gulurónico, unidos por enlace  $\beta(1-4)$ . Su estructura química se representa en la figura 1.4. Originariamente era producido por algas marrones (*Phaeophyceae*), pero la producción desde bacterias se ha demostrado mucho más efectiva, donde *Azotobacter vinelandii* ha sustituido a *P. aeruginosa* como especie productora, debido a que la primera no es cepa patogénica mientras que si lo es la segunda.



**Figura 1.4. Estructura química del biopolímero alginato.**

## 2.2. Dextrano

El dextrano es un homopolisacárido formado solamente por residuos de D-glucosa unidos por enlaces  $\alpha$  (1-6), y con ramificaciones en forma de enlace  $\alpha$  (1-3). La estructura química del polímero se muestra en la figura 1.5. Presenta un rango muy amplio de pesos moleculares: desde 3 hasta 3000 kDa). Tradicionalmente ha sido producido por bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* o *Streptococcus mutans*, utilizando sacarosa como sustrato, en un medio MRS (Man, Rogosa y Shape), donde tras el crecimiento microbiano, el polímero es fácilmente extraíble por centrifugación (Subathara Devi et al., 2014).

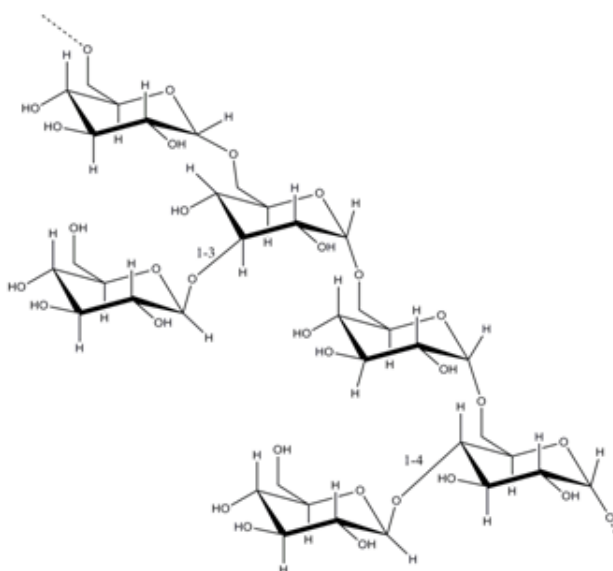


Figura 1.5. Estructura química del biopolímero dextrano.



### 2.3. Goma xantana

La goma xantana es un exopolisacárido formado por glucosa unida por enlaces  $\beta$  (1-4) con una ramificación en forma de trisacárido formado por D-glucurónico entre dos residuos de manosa. Esta ramificación aparece cada dos o cuatro residuos de glucosa. Su estructura química se muestra en la figura 1.6. Se ha utilizado habitualmente como estabilizador de emulsiones o controlador de viscosidades. Sin embargo, en los últimos años ha tomado importancia por sus aplicaciones biomédicas (García-Ochoa et al., 2000).

Es producido de forma natural por la bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris*, en medio YM (Yeast and Mold), obteniendo grandes rendimientos productivos, mientras que, sin embargo, la limitación ocurre con la purificación debido a su elevada viscosidad (Palaniraj y Jayaraman, 2011).

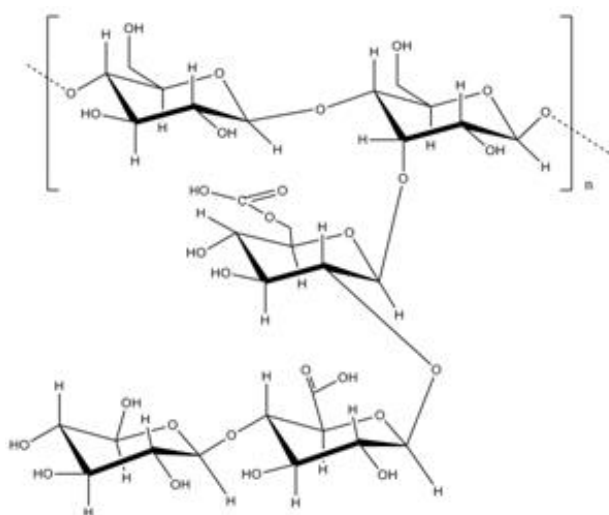
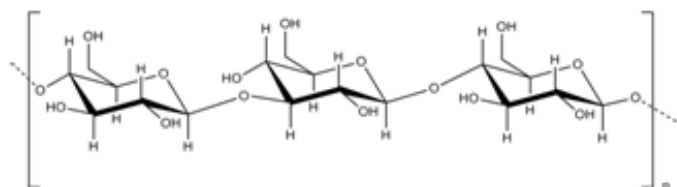


Figura 1.6. Estructura química del biopolímero goma xantana.

## 2.4. Curdlano

El curdlano es el exopolisacárido más conocido de todos los incluidos dentro de la familia de los  $\beta$ -glucanos. Concretamente, el curdlano es un glucano unido con enlaces  $\beta$  (1-3) que es producido por bacterias como *Agrobacterium sp.* o *Alcaligenes faecalis* en procesos fermentativos donde debe controlarse la fuente de nitrógeno dado que solamente se produce en ausencia de este elemento. Por esta razón, suele cultivarse en dos etapas, una primera que permite el crecimiento bacteriano, y otra segunda, con limitación de nitrógeno, para la producción del polisacárido (Kalyanasundaram et al., 2012). Su estructura química se muestra en la figura 1.7.

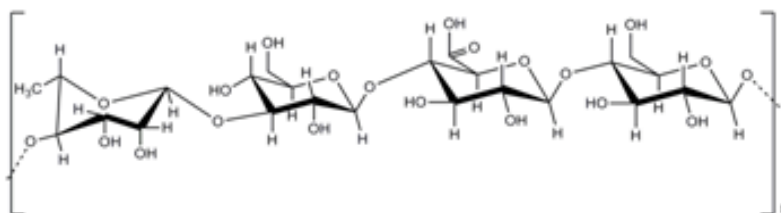


**Figura 1.7. Estructura química del biopolímero curdlano.**

## 2.5. Goma gellan

La goma gellan es un polisacárido aniónico formado por la repetición de un tetrasacárido compuesto por glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa. Aproximadamente el 1,5% de sus grupos acilo se encuentran en forma de glicerato o de acetilos. La cantidad o abundancia

de estos grupos condiciona sus propiedades físicas (Hasheminya et al., 2013). Su estructura química se muestra en la figura 1.8.

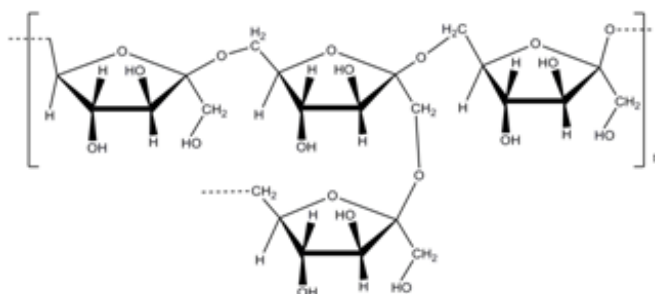


**Figura 1.8. Estructura química del biopolímero goma gellan.**

Es producida por la fermentación de las bacterias del género *Shingomonas*, principalmente *S. paucimobilis*, por cultivo de inmersión. Como en el caso de la goma xantana, la mayor limitación viene dada por la precipitación y separación debido a su viscosidad.

## 2.6. Levano

El levano (o levan) es un homopolisacárido producido por la repetición de unidades de fructosa gracias a la acción de la enzima levan-sacarasa, que se encuentra en muchos microorganismos y algunas plantas. Dicha enzima se encarga del hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa para polimerizar posteriormente las fructosas con enlace  $\beta$  (2-6) y algunas ramificaciones en  $\beta$  (1-6). Su estructura química se muestra en la figura 1.9.



**Figura 1.9. Estructura química del biopolímero levan.**

El parámetro más importante a controlar en el medio es el pH (Srikanth et al., 2015; Öner et al, 2016). Tradicionalmente se ha producido desde microorganismos como *Zymomonas mobilis* o bacterias del género *Bacillus*.

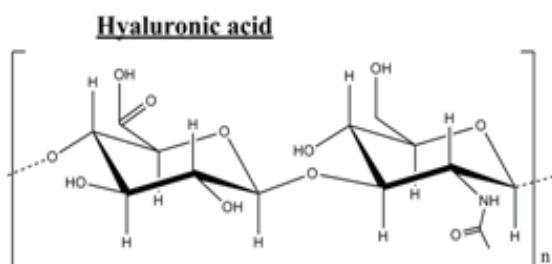
Este será el polímero objeto de estudio de la tesis doctoral, y, por tanto, será abordado en profundidad en la sección cuarta de este capítulo.

## 2.7. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polímero de alto peso molecular, completamente lineal, que se ha obtenido tradicionalmente de las crestas de los gallos. Sin embargo, también puede ser obtenido de forma biotecnológica mediante el cultivo de *Streptococcus equi* o *Streptococcus zooepidemicus* en medios con alto contenido en glucosa, lisina y arginina (Liu et al., 2011).

Está formado por la repetición de un disacárido formado por N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico, unido por enlaces  $\beta$  (1-4); y

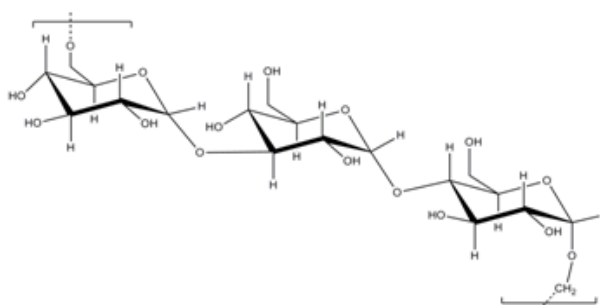
unión  $\beta$  (1-3) entre los disacáridos (Lapcik et al., 1998). Su estructura química se muestra en la figura 1.10.



**Figura 1.10. Estructura química del ácido hialurónico.**

## 2.8. Pululano

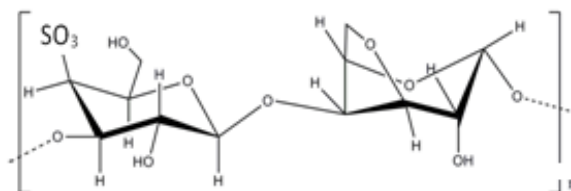
El pululano es un homopolisacárido formado por maltotriosas (tres residuos de maltosa unidos por enlaces  $\alpha$  (1-4)), unidas entre sí por enlace  $\alpha$  (1-6). Es producido por *Aurebasidium pullulans*, que se cultiva en biorreactores con medio de cultivo estándar y aireación, donde se ha visto que la limitación de nitrógeno mejora considerablemente la síntesis del polímero, por lo que un cultivo en dos etapas suele ser lo más efectivo (Rehm, 2010; Wang et al., 2015). Su estructura química se muestra en la figura 1.11.



**Figura 1.11. Estructura química del biopolímero pululano.**

## 2.9. Carragenano

El nombre carragenano es un genérico para designar a todo un grupo de heteropolisacáridos que derivan de un mismo precursor conocido como  $\gamma$ -carragenano, que está formado por la repetición de un disacárido de D-galactosas unidas por enlace  $\beta$  (1-4). Desde este carragenano, se obtienen los demás, que se identifican con las letras griegas:  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\kappa$ ,  $\nu$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ . Se caracterizan por la capacidad de formar geles viscosos y con un elevado contenido en sulfatos (entre el 15 y el 40%), lo que les convierte en polímeros muy aniónicos (Yadav et al., 2015). Actualmente se producen desde el cultivo de macroalgas en biorreactores, donde el control del medio de cultivo permite el control de sus propiedades (Stengel y Connan, 2015). La estructura química del  $\kappa$  - carragenano se muestra en la figura 1.12.



**Figura 1.12. Estructura química del biopolímero  $\kappa$  -carragenano.**

### **3. APLICACIONES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS EN BIOMEDICINA**

Durante mucho tiempo, los científicos han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos materiales que puedan tener aplicaciones de interés en biomedicina.

Los exopolisacáridos presentan diferentes grados de hidrofobicidad, estructura molecular, energía de superficie, adsorción de agua, que dependen del microorganismo encargado de su producción. Tienen grupos superficiales, que les confieren algunas propiedades interesantes como la posibilidad de realizar reacciones químicas en su superficie, que pueden ser de utilidad en numerosas aplicaciones. En este sentido, cabe destacar la abundante presencia de grupos hidroxilo, carboxilo o amino en los exopolisacáridos, que pueden formar enlaces no covalentes con los tejidos biológicos, facilitando su bioadhesión. Esto también supone una ventaja para la compatibilidad del material con tejidos y sangre (Nwodo et al., 2012).

Además de las propiedades descritas anteriormente, los exopolisacáridos son generalmente polímeros con carga (la mayoría de ellos aniónica), y, por tanto, si son usados para construir un sistema de liberación controlada de fármacos, esta característica puede usarse como forma de controlar la liberación de los mismos (modificación de pH, estimulación eléctrica, estimulación magnética) (Freitas et al., 2011; Nwodo et al., 2012; Moscovici, 2015).

A lo largo de esta sección se van a explicar las diferentes aplicaciones ya exploradas en biomedicina de distintos exopolisacáridos. Concretamente se tratará la cicatrización de heridas, la regeneración ósea y la ingeniería de tejidos, y el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos a escala nano.

Específicamente, en la Tabla 1.1 se muestran los exopolisacáridos más comunes en este campo (descritos en el apartado anterior), y sus principales aplicaciones en biomedicina y otros campos (Freitas et al., 2011; Nwodo et al., 2012; Moscovici, 2015; Yadav et al., 2015).

**Tabla 1.1. Principales exopolisacáridos utilizados en biomedicina: carga, propiedades y aplicaciones.**

<i>Biopolímero</i>	<i>Carga</i>	<i>Propiedades</i>	<i>Principales aplicaciones</i>
<i>Alginato</i>	Aniónico	Solubilidad en agua Formación de geles Propiedades como film Presencia de endotoxinas	Cicatrización de heridas Agente de encapsulación
<i>Dextrano</i>	No cargado	Solubilidad en agua Formación de geles	Reducción viscosidad sangre Agente recubrimiento Formación de nanopartículas con viscosidad intrínseca
<i>Goma xantana</i>	Aniónico	Formación de geles Alta viscosidad Solubilidad en agua	Estabilización de partículas Cosmética
<i>Curdano (<math>\beta</math>-glucano)</i>	No cargado	Formación de geles Insoluble en agua, pero soluble en sol. alcalinas Alta bioactividad	Agente estabilizante Inhibición de tumores Encapsulación de polinucleótidos
<i>Goma gellan</i>	Aniónico	Estabilidad a alta temperatura Comportamiento complejo en agua	Ingeniería de tejidos y regeneración ósea
<i>Levano</i>	No cargado	Propiedades como film Comportamiento	Agente de encapsulación Cosmética



		anfífilo No forma geles Baja solubilidad en agua Adhesión celular	Agente recubrimiento
<b>Ácido hialurónico</b>	Aniónico	Humectante de piel Adhesión celular Buenas propiedades reológicas Interacción con CD44	Cosmética Ingeniería de tejidos y regeneración ósea Liberación ocular de fármacos Diagnóstico de cáncer
<b>Pululano</b>	No cargado	Formación films Soluble en agua Afinidad hepática Propiedades antioxidantes	Liberación hepática de fármacos Ingeniería de tejidos Estabilizador de partículas
<b>Carragenanos</b>	Aniónico	Dependiendo del tipo: soluble en agua, formador de geles Cierta toxicidad Alta carga aniónica	Formación de partículas Liberación controlada de fármacos Algunos derivados con interés biológico

### 3.1. Cicatrización de heridas

Boateng et al. (2008) definieron una herida como “una lesión o alteración de la estructura y funciones anatómicas, como resultado de la ruptura simple o grave de la estructura de un órgano, como la piel, y puede extenderse a otros tejidos y estructuras como los tejidos subcutáneos, músculos, tendones, nervios, vasos, e incluso al hueso”. Para evitar la contaminación de la herida, debe aplicarse algún recubrimiento sobre ella. Estos materiales se pueden clasificar en:

- 1) polímeros naturales que son biocompatibles y biodegradables;
- 2) materiales bioactivos que añaden, además, un efecto terapéutico;

3) polímeros sintéticos que tienen propiedades de adhesión e hidrofílicas, y una adecuada capacidad de absorción.

De estos materiales anteriormente citados, los polímeros sintéticos han sido los más usados. Recientemente, los hidrogeles también han ido ganando importancia debido a sus propiedades. Los hidrogeles generan un proceso de hinchamiento sin cambiar las propiedades y estimulan la regeneración porque crean un entorno humectado. Además, protegen a la herida de una segunda infección y tienen comportamiento maleable. Debido a su naturaleza gelatinosa, los polímeros sintéticos también son muy útiles para regenerar heridas con formas no convencionales (Boateng and Catanzo, 2015).

En los últimos 20 años ha existido un incremento en la investigación para producir estos recubrimientos con fármacos que faciliten la regeneración y favorezcan la cicatrización ordenada. Esto ha ido sustituyendo a la forma tradicional de cicatrización realizada con algodón, gasas o lana. A pesar de que no favorece el entorno ideal para la regeneración de la herida, estos últimos son los más baratos y sencillos de aplicar, y por esto, siguen siendo los más empleados.

### **3.2. Regeneración ósea e ingeniería de tejidos**

Las fracturas óseas o heridas en el hueso son producidas por diferentes causas, y tratadas en su mayoría con autoinjertos, xenoinjertos o aloinjertos. Sin embargo, estas técnicas tienen un inconveniente en común: la posibilidad de ser contagiado por una enfermedad (Venkatesan et al.,

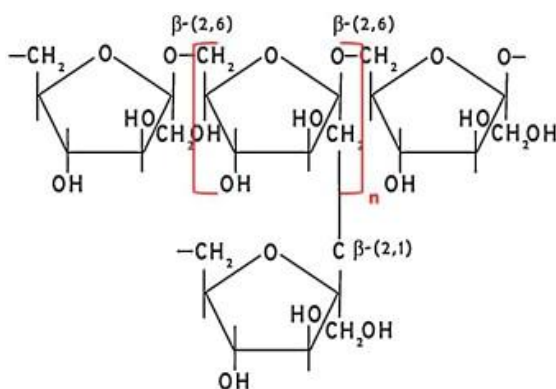
2015). Esta es la razón por la que hay una tendencia a desarrollar soportes sólidos, conocidos como “*scaffolds*”. Son estructuras en tres dimensiones que pueden ser usadas para el crecimiento de células que promuevan el desarrollo del tejido, y que son las que ya desarrollan ese papel en los tejidos sanos, para el crecimiento y regeneración del hueso. En este caso, es necesario un buen tamaño de poro (al menos 100 micras), y una buena interconexión entre los poros; especialmente en el caso de que tenga que contener factores de crecimiento (que ayudan a la proliferación celular). Se ha visto que los exopolisacáridos presentan buenas propiedades biológicas para la regeneración del hueso y otros tejidos, así como son buen soporte para la proliferación de células y su adhesión a los tejidos (Lee and Money, 2012).

### **3.3. Nanopartículas para liberación de fármacos**

En los últimos años, se han desarrollado nuevas vías para liberar fármacos de forma controlada. La principal ventaja de estos sistemas es su capacidad de mantener la dosis terapéutica del fármaco en la sangre, y así reducir posibles efectos adversos y mejorar la vida del paciente. En este sentido, los sistemas nanométricos de liberación controlada de fármacos (tamaño inferior a 100 micras) son prometedores, porque pueden avanzar por pequeños capilares en la sangre, y entrar en células y tejidos hasta alcanzar los órganos diana (Liu et al., 2008; Martín del Valle et al., 2009). En este sentido, por sus propiedades, los exopolisacáridos se consideran muy adecuados para estos fines.

## 4. BIOPOLÍMEROS A BASE DE FRUCTOSAS. LEVANO

Como se ha comentado anteriormente, el levan o levano es un polímero formado por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6), con ramificaciones  $\beta$  (1-6). Tradicionalmente, ha sido producido desde bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, etc. gracias a la acción de la enzima levan-sacarasa que es capaz de hidrolizar el disacárido sacarosa y polimerizar la fructosa hasta constituir el polímero. La estructura química del polímero se muestra en la figura 1.13.



**Figura 1.13: Estructura del biopolímero levan. Representación de la cadena lineal  $\beta$  (2-6) y de las ramificaciones  $\beta$  (1-6).**

A lo largo de esta sección se realizará una revisión bibliográfica del biopolímero levan y su producción, tanto desde el punto de vista productivo, como el propio mecanismo catalítico de la enzima; seguidamente se expondrán las principales aplicaciones de este polímero

que ya han sido descritas en la bibliografía y que constituyen la base de trabajo sobre las que se desarrollarán el resto de los estudios presentes en la tesis doctoral.

#### **4.1. La enzima levan-sacarasa. Mecanismo catalítico.**

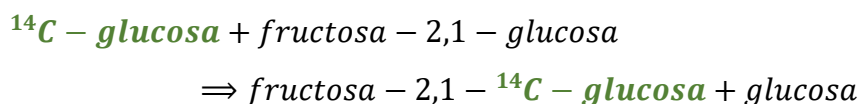
La enzima levan-sacarasa (E.C. 2.4.1.10) es una enzima muy bien caracterizada dentro de la familia de las fructosil-transferasas, y es la responsable de la síntesis del polímero levan en la mayoría de las plantas y los microorganismos (Velazquez-Hernandes et al., 2009). Las enzimas más estudiadas son las que se han obtenido desde *Z. mobilis* y desde *B. subtilis*, conocidas como SacA en el primer caso y SacB en el segundo, mostrando un elevado grado de homología en su secuencia. La estructura proteica de la levan-sacarasa es un polipéptido monomérico, elipsoide y compacto, que se ve involucrada en los procesos de simbiosis (*Bacillus polymixa*), fitopatogénesis (*Erwinia* o *Pseudomonas*) y supervivencia bacteriana en suelo (*B. subtilis*) (Ammar et al., 2002; Le Gorrec et al., 2002). Posee un peso molecular entre 51 y 58 kDa según las especies. La estructura cuaternaria de la proteína se muestra en la figura 1.14, con la representación obtenida desde *Protein Data Bank* (PDB).



**Figura 1.14: Representación de la estructura cuaternaria de la levansacarasa de *B. subtilis*. Fuente: Meng y Futterer, en PBD (2003).**

La enzima presenta tres tipos de actividades diferentes: fructosiltransferasa, polimerasa e hidrolasa; que se van a detallar a continuación (Marques Gonsalves et al., 2015):

- La **actividad fructosiltransferasa** se caracteriza por la transferencia de residuos de fructosa desde la sacarosa a un aceptor, que puede tener diferente naturaleza. El aceptor es, en primer lugar, el agua, durante la hidrólisis de la molécula de sacarosa, y, en segundo lugar, la glucosa, favoreciendo la siguiente reacción:



Finalmente, la sacarosa puede actuar también como aceptor, cuando se comienza a trabajar con oligofructanos. También se ha demostrado que algunos alcoholes pueden actuar como receptores en la

reacción de transfructosilación (Martínez-Fleites et al., 2005). Algunos microorganismos como *Aerobacter levanicum* son capaces de transferir grupos aldósilos en lugar de fructosilo, como, por ejemplo, L-sorbosil o D-xilulosil, añadiendo modificaciones a la cadena de polifruktosas si éstos componentes se encuentran en el medio.

- La **actividad polimerasa** es mucho más reducida que la fructosiltransferasa, y prácticamente es inexistente si existe sacarosa en el medio, favoreciendo la reacción de transfructosilación. Cuando no hay sacarosa presente, adquiere cierta importancia, donde la polimerización ocurre en múltiplos de trisacáridos (tres monómeros de fructosa se unen junto a otros tres monómeros de fructosa). Esta actividad catalítica no está tan estudiada como la anterior.
- La enzima posee, además, **actividad hidrolasa**, hacia la sacarosa (capaz de hidrolizar en glucosa y fructosa, para usar la fructosa en la polimerización), y hacia su propio producto, el polímero levan. La actividad hidrolasa comienza en el extremo de glucosa, y se detiene cuando llega a un punto de ramificación. Esta actividad de auto-hidrólisis, también conocida como levanasa, reduce la cantidad de cadenas pequeñas producidas en una síntesis (Méndez-Lorenzo et al., 2015).

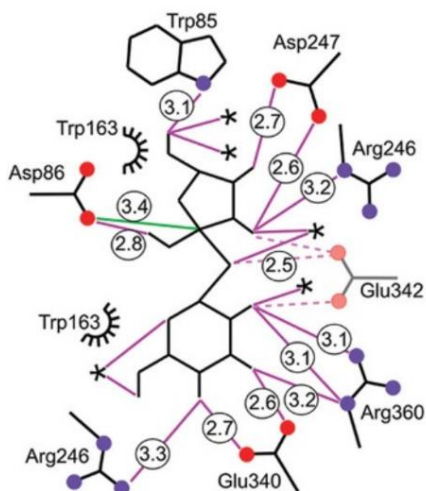
Una vez conocidas las actividades, es posible detallar el mecanismo catalítico global de la enzima, que sigue, según Chambert et al. (1974, 1976), un mecanismo de Ping-Pong. Este mecanismo implica que el primer sustrato (sacarosa) genera una modificación en la enzima que permite que actúe sobre el segundo sustrato (fructosa).

Concretamente, en este caso, lo que parece suceder es la formación de un intermediario entre la enzima y el residuo fructosilo, que reduce la entalpía de activación, para la incorporación del siguiente residuo fructosilo.

La reacción, por tanto, ocurre de la siguiente manera: existen dos sacarosas en el centro activo, donde una de ellas actúa como donadora de un residuo fructosilo (debido a la hidrólisis) y la otra actúa como receptora del mismo. El ataque de este residuo puede ocurrir por el oxígeno 1 o por el oxígeno 6, formando 1-kestosa o 6-kestosa. Es necesario que se forme esta última, pues es desde la que se puede proseguir la polimerización dado que tiene enlaces  $\beta$  (2-6).

En este mecanismo, hay tres aminoácidos que tienen gran importancia, y son el Glutámico de la posición 342 (Glu342), el Aspártico de la posición 86 (Asp86) y el Aspártico de la posición 247 (Asp247). Este último parece formar un enlace entre la enzima y el residuo fructosilo al inicio de la reacción, favoreciendo un pequeño cambio conformacional, que facilita la transfructosilación posterior de más residuos (Meng y Fütterer, 2003). La imagen siguiente, tomada de la publicación de Meng y Fütterer (2003), representa la disposición espacial de los aminoácidos implicados en el mecanismo catalítico, así como las moléculas con las que establecen el contacto.





**Figura 1.15: Esquema del mecanismo catalítico de la enzima levana-sacarasa.**  
**Fuente: Meng y Fütterer (2003).**

Varios estudios de mutagénesis se han realizado con el fin de estudiar mejor el mecanismo, así como para conseguir enzimas más eficientes en la producción. Es destacable el estudio de mutagénesis más reciente, elaborado por He et al. (2018), donde se analizó el efecto de seis variedades mutantes en el peso molecular y en la velocidad de producción. Los resultados mostraron que las mejores velocidades se siguen consiguiendo con la cepa silvestre, y que la modificación de algunos residuos modifican el peso molecular del producto, desde cadenas largas y lineales, hasta pequeñas cadenas de fructooligosacáridos (FOS).

#### **4.2. La producción microbiana de leván.**

La forma tradicional de producir el biopolímero leván ha sido mediante el uso de microorganismos que expresaban la enzima levana-

sacarasa, mediante el cultivo en fermentadores controlando algunos parámetros importantes que se detallan a continuación en esta sección. La enzima es producida por traducción en los ribosomas y se acumula en el periplasma, donde adquiere su conformación final antes de ser conducida hacia el exterior celular. Se conocen dos tipos de mecanismos de excreción de la enzima, dependiendo el tipo de bacteria. En el caso de las bacterias Gram-positivas se trata de un proceso que engloba dos partes. Primeramente se elimina el péptido señal y seguidamente, se produce el plegamiento final que otorga a la proteína su función de catalizador (Donot et al., 2012). La presencia de iones calcio o algunos metales como el hierro facilita la señal para la excreción. Por el contrario, en el caso de las Gram-negativas, no se produce un plegamiento final, sino que simplemente ocurre la migración debido al péptido señal. En ambos casos, la señal crucial para la excreción es la variación del pH, concretamente, la aparición de un medio ligeramente ácido (pH entre 5-6 aproximadamente) (Venugopal, 2011).

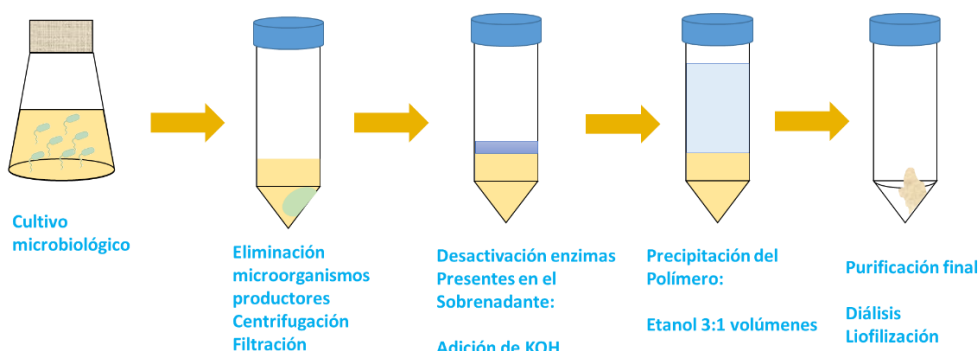
El cultivo microbiano se lleva a cabo generalmente en forma de fermentación sumergida. Fueron Hestrin et al., en 1943, los primeros en describir un proceso fermentativo para la producción de este polímero con *B. subtilis*, y utilizando sacarosa como sustrato principal. A finales del siglo XX aparecieron algunos otros trabajos abordando el cultivo microbiano, pero con la llegada del nuevo siglo, es cuando se han publicado más trabajos relacionados con la producción microbiana de este polímero.

Concretamente, más de 60 estudios ya se han publicado (Srikanth et al., 2015), donde se estudian condiciones de operación para maximizar la producción de este polímero, con diferentes especies productoras. Estos estudios van encaminados a estudiar el efecto que tienen las fuentes de carbono o nitrógeno en la producción del polímero, así como otros oligoelementos. De todos los estudios es destacable la uniformidad en algunos de los parámetros del cultivo, con valores muy semejantes entre las diferentes publicaciones:

- Agitación: entre 100 rpm y 200 rpm en agitación magnética
- Temperatura: entre 25°C y 40°C
- pH del cultivo: entre 5.2 y 7.0

Con respecto a la duración del cultivo, es donde se observan las mayores diferencias. Hay autores que solamente trabajan en cultivo batch de 21 horas (Shih y Yu, 2005), mientras que otros autores lo mantienen durante 6 días (Linde et al., 2012).

Una vez que ha terminado el cultivo, corresponden etapas sucesivas de purificación del producto, hasta conseguir el polímero con un elevado grado de pureza. El proceso resumido de la purificación desde el medio de cultivo se resume en la figura 1.16.



**Figura 1.16. Esquema de las etapas de purificación del polímero a partir del medio de cultivo.**

Estas etapas sucesivas, asociadas a la producción microbiana son, por orden de acción, las siguientes:

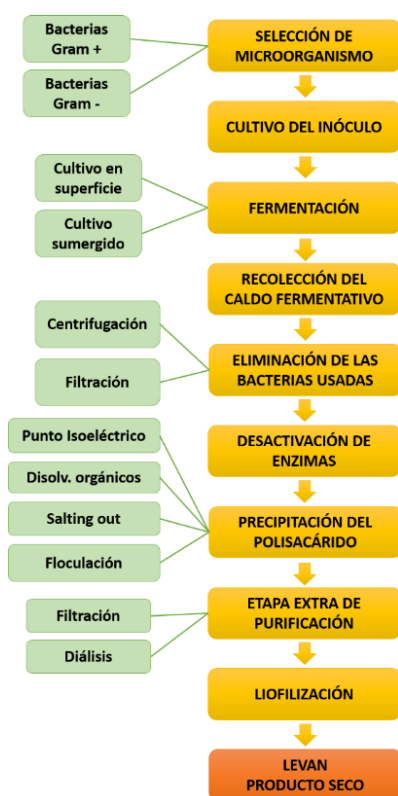
- **Eliminación de los microorganismos productores:** la eliminación de las bacterias que han proliferado y colaborado en la síntesis del polímero es el primer paso del tratamiento “*downstream*” del polímero. Las bacterias pueden ser eliminadas por filtración, o más comúnmente por centrifugación, debido a la diferencia de densidades. Diferentes relaciones de velocidad y tiempo de centrifugación han sido publicadas, asumiéndose en todos los casos, que la centrifugación puede realizarse a temperatura ambiente. Una vez que se ha producido la centrifugación, se procede a separar los sólidos (bacterias) y el sobrenadante (que contiene el polímero).
- **Desactivación de las enzimas presentes en el sobrenadante:** con el sobrenadante obtenido en la etapa anterior, es necesario bloquear las enzimas que fueron secretadas al medio, y que podrían continuar realizando su función: tanto la actividad polimerasa, como la actividad hidrolasa. Esto puede realizarse al calentar durante 5 minutos el medio

de cultivo hasta hervir, seguido de la adición de potasas (KOH), hasta alcanzar pH 10 (Jathore et al., 2012).

- **Precipitación del polisacárido:** existen varias formas de precipitar exopolisacáridos: basándose en el punto isoelectrico, utilizando disolventes orgánicos, por floculación con electrolitos, o por la adición de sales o *salting out* (Srikanth et al., 2015). Para el caso del biopolímero *levan*, lo más habitual es emplear una precipitación basada en disolventes orgánicos, concretamente etanol. Sobre la disolución de sobrenadante a pH 10, se procede a la precipitación del polímero, utilizando etanol al 75% y en frío. Como norma general, en los trabajos analizados, se añaden 3 volúmenes de etanol por cada volumen de sobrenadante. A esto se debe añadir 1 mL de una disolución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) cada 10 mL de muestra, que promueve la precipitación. El polímero es muy insoluble en etanol, y, por tanto, no es capaz de dispersarse en este medio, precipitando. Algunos autores han sugerido la posibilidad de conservar esta mezcla bajo congelación ( $-20^\circ\text{C}$ ) para reforzar la precipitación, obteniendo mejores rendimientos en este proceso (Franken et al., 2013).
- **Purificación final del producto:** para proceder a la separación del precipitado (polímero) del sobrenadante (etanol y restos del caldo) se realiza de nuevo una centrifugación, donde se conserva la parte sólida (pellet), descartándose el sobrenadante. El pellet contiene otras sustancias además del polímero, que deben ser eliminadas para conseguir un elevado grado de pureza en el producto objetivo. En muchos casos, la opción más empleada es la re-suspensión del polímero, y su diálisis, en membranas de 1 a 3,5 kDa, para la eliminación de pequeños componentes del medio de cultivo que

pudiesen haber precipitado, frente a agua desionizada. La diálisis puede mantenerse durante varios días, con cambios frecuentes de agua, facilitando la separación de estos componentes (Ua-Arak et al., 2017). Finalmente, el contenido de la bolsa de diálisis, que contiene el polímero purificado, es liofilizado para conseguir retirar todo el agua, y dejar el producto seco para ser conservado.

La figura 1.17 representa el diagrama de flujo de la producción de levan desde microorganismos, estudiando las alternativas para cada etapa.



**Figura 1.17: Etapas en la producción microbiana del polímero levan**

#### **4.3. La purificación de la enzima. Trabajo con sistemas libres de microorganismos (*Cell-free systems*)**

La producción microbiana de los exopolisacáridos ha sido y sigue siendo la más utilizada por la industria para obtener estos compuestos. Esta producción conlleva todas las etapas que se han descrito, de forma específica para el polímero levan, en la figura 1.17. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas recombinantes permitió, a finales del siglo pasado, conseguir grandes expresiones de enzimas, que permitieran la catálisis sin utilizar organismos vivos, en lo que se conoce como *cell-free systems* (sistemas libres de células).

Esta operación se basa en producir en cantidades abundantes la proteína (enzima) encargada de la catálisis del proceso, desde un microorganismo concreto (se puede hacer incluso en un microorganismo en el que no se exprese de forma natural), y purificarla adecuadamente de tal forma que la tengamos con un elevado grado de pureza. Esta enzima puede ahora ser usada como catalizador para la reacción, y, por tanto, los primeros pasos del proceso (selección de microorganismo, cultivo de inóculo, fermentación, recolección del caldo fermentativo, eliminación de las bacterias usadas) no serían necesarios, suponiendo un abaratamiento del coste. Sin embargo, el producto obtenido por los sistemas libres de células no siempre cumple con las mismas propiedades del producto obtenido de forma microbiana, y esto hace, que, en muchas ocasiones, se siga produciendo en la forma tradicional.

La gran ventaja que ofrecen estos sistemas, como se describirá en el capítulo 7 de esta tesis, es la posibilidad de trabajar con estas enzimas inmovilizadas, de tal forma que se pueden reciclar durante varios ciclos, reduciendo aún más los costes productivos, que suelen ir asociados a la compra o purificación de la enzima en concentraciones considerables.

En el caso de la enzima objeto de estudio de esta tesis doctoral, la enzima levan-sacarasa, se han llevado a cabo numerosos estudios para mejorar la forma de producirla, y de purificarla; y en los últimos años están apareciendo publicaciones que comienzan a utilizar esta enzima como forma de producir el polímero, sin recurrir a los microorganismos.

La primera referencia relacionada con la obtención de esta enzima fue realizada por Reese y Avigad, en 1966, donde consiguieron precipitar la enzima junto al polímero recién obtenido por fermentación microbiana. Diez años más tarde, Whitaker y Edwards (1976) pusieron a punto el primer método para la purificación de la enzima en exclusiva. A partir de ese momento se fue mejorando la forma de purificar enzimas obteniendo mejores rendimientos, pero todavía se obtenía solamente la cantidad de enzima constitutiva. Es decir, no se había producido ninguna modificación en el genoma de las bacterias que promoviera una mayor síntesis de enzima, o que facilitase su secreción.

Como norma general, los **procesos de purificación de la enzima levan-sacarasa** siguen las siguientes etapas (Cote e Imam, 1989):



- Eliminación de las bacterias: la enzima ha sido secretada al medio extracelular, favorecido por un pH bajo y la presencia de ciertas sales. Las bacterias son eliminadas por centrifugación o filtración.
- Concentración del caldo de crecimiento: la enzima se encuentra en baja concentración, por lo que el caldo es dializado sobre una membrana con un corte en el peso molecular que permita la salida de los nutrientes no usados del medio, pero que retenga la proteína.
- Purificación de la proteína deseada (enzima levan-sacarasa) y separación del resto por cromatografía de intercambio iónico Sepharose-DEAE, o por electroforesis en gel de poliacrilamida.

En 1995 se tiene constancia de la primera clonación del gen (Sprenger et al., 1995) de esta enzima, y su expresión en otro organismo (*Nicotiana plumbaginifolia*) para conseguir mayor cantidad de enzima producida. Desde entonces, el gen se ha expresado en protoplastos vegetales, en bacterias (Malten et al., 2006) Gram positivas y Gram negativas, y en algunas levaduras como *Pichia pastoris* (Kang et al., 2011). Se han conseguido producir grandes cantidades de proteína tras la ingeniería genética llevada a cabo en los diferentes organismos, llegando a producir 14,400 U/L.

## 5. PROPIEDADES DEL POLÍMERO LEVAN

En los últimos años se han publicado varios trabajos que sugieren las diferentes aplicaciones del polímero basándose en sus propiedades más importantes, que son: solubilidad, resistencia a la tracción, viscosidad. A lo largo de esta sección se van a describir cada una de estas tres propiedades, y otras que también pueden resultar de interés.

### 5.1. Solubilidad

El levan es soluble en agua y algún disolvente orgánico como el dimetil sulfóxido (DMSO). Realmente no se trata de una disolución como tal, sino de una dispersión, formando un coloide, como se demostrará más adelante en esta tesis doctoral. Es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, como el metanol, isopropanol, dimetil-formamida, o etanol (este último usado para precipitarlo de su reacción de síntesis). Al igual que otros polímeros, no tiene efecto de hinchazón (*swelling*) en agua, es decir, no es capaz de captar moléculas de agua, e hidratarse (Ullrich, 2009).

### 5.2. Resistencia a la tracción

La estructura del polímero combina: ramificaciones, que ayudan a generar fuerzas cohesivas, y muchos grupos hidroxilo, que forman enlaces con gran variedad de sustratos. Es un material muy potente para la construcción de adhesivos, por su elevada resistencia a la tracción sobre

aluminio, y su buena resistencia a la cizalladura sobre plásticos. En algunos casos, esta resistencia puede superar a adhesivos obtenidos desde derivados del petróleo. Por ejemplo, en el caso del aluminio, la resistencia a la tracción alcanza los 1500 psi bajo algunas condiciones y superficies concretas (Rehm, 2009).

### **5.3. Viscosidad**

La viscosidad de este polímero no sigue el patrón habitual de otros polisacáridos, teniendo una viscosidad intrínseca muy baja si se compara con otros polímeros de elevado peso molecular. Esto puede explicarse porque no queda completamente disuelto en agua sino disperso, formando una solución coloidal. Los estudios de Stivala y Bahary (1978), demostraron que la viscosidad intrínseca de este polímero se situaba en el rango de 0.1 a 0.2 dL/g, dependiendo del disolvente y la temperatura. La viscosidad de las disoluciones de levan no se ve prácticamente afectada por la adición de sales o el pH, mientras que la temperatura sí condiciona la viscosidad, especialmente a partir de 70°C (Vina et al., 1998). Cuando se alcanza el 50% en concentración (peso/peso), empieza a comportarse como una goma de mascar (Ullrich, 2009).

Esta baja viscosidad intrínseca potencia su uso para las aplicaciones farmacéuticas, resultando más sencillo trabajar con el polímero, debido a que reduce uno de los mayores inconvenientes de la industria de los biopolímeros, que es el flujo de fluidos muy viscosos.

## 5.4. Otras propiedades

Como otras propiedades interesantes, merece destacar su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, y su no-irritabilidad ocular (abriendo una nueva vía de aplicaciones, basadas en la liberación ocular de fármacos). El polímero es estable hasta altas temperaturas, teniendo su punto de fusión a 225°C (Ullrich, 2009). El polímero no puede ser hidrolizado por las amilasas ni tampoco por las invertasas secretadas por las levaduras (Gupta et al., 2011).

En la tabla siguiente se muestran las principales propiedades descritas para el polímero y las ventajas que éstas ofrecen para su aplicación en la industria biomédica.

**Tabla 1.2. Relaciones de propiedades y ventajas-aplicaciones del biopolímero levan en biomedicina.**

PROPIEDAD	VENTAJA O APLICACIÓN
Dispersión en lugar de disolución en agua o DMSO	Formación de coloides con cavidades hidrofóbicas (NPs)
No tiene efecto hinchazón ( <i>swelling</i> )	Geles y partículas de volúmenes controlados
Numerosos grupos hidroxilo y ramificaciones	Resistencia a la tracción Construcción de adhesivos
Baja viscosidad intrínseca, no alcanza aspecto de goma hasta altas concentraciones	Se evita trabajar con fluidos muy viscosos
Biodegradable y biocompatible No-irritabilidad ocular No se hidroliza de forma sencilla	Facilidad para ser implantado o administrado en el cuerpo humano

## **6. LAS PRINCIPALES APLICACIONES DE LEVAN EN LA INDUSTRIA BIOMÉDICA**

Debido a las propiedades antes mencionadas y enumeradas en la Tabla 1.2, se han desarrollado diferentes aplicaciones del polímero en biomedicina. A lo largo de las siguientes secciones se presentan algunos de los trabajos más destacables de esos posibles usos del biopolímero: anti-inflamatorio, anti-tumoral, anti-oxidante, soporte para la proliferación celular, prebiótico, constituyente de sistemas de liberación controlada de fármacos o constituyente de films.

### **6.1. Agente anti-inflamatorio**

Los primeros datos reportados de esta acción anti-inflamatoria fueron propuestos por Liu y colaboradores (2010), quienes sugirieron que el levan tenía propiedades anti-inflamatorias al medir la viabilidad celular por ensayo MTT en esplenocitos (células fagocíticas procedentes del bazo) de ratones BALB/c tras ser tratados con diferentes cantidades de este polímero obtenido desde *Bacillus licheniformis*. Los resultados demostraron una mayor proliferación de los esplenocitos tras este tratamiento. Sin embargo, para conseguirlo se necesitan cantidades muy elevadas (alrededor de 0.8 mg/mL) si se comparan con otras sustancias que pueden funcionar de forma semejante (como el lipopolisacárido bacteriano).

Recientemente, esta capacidad anti-inflamatoria ha ido ganando más importancia y Dong et al. (2015) pusieron fin al problema de la

elevada concentración necesaria gracias a una adecuada purificación y al uso de otro microorganismo para la producción de levan (*Curcuma kwangsiensis*). Demostraron que existe dicho efecto a concentraciones realmente bajas (10 µg/mL) y cuantificaron su efecto en la fagocitosis, que se vio incrementado hasta un 40% con respecto al control. Por otro lado, Sriikanth et al. (2015) compararon el efecto anti-inflamatorio de levan con el de otro fármaco muy usado para este fin, el diclofenaco sódico. Se observó que el efecto de levan era del 71% comparado con el fármaco modelo. Estos resultados resaltan la posibilidad de utilizar el levan como una sustancia anti-inflamatoria de gran potencial y de origen natural.

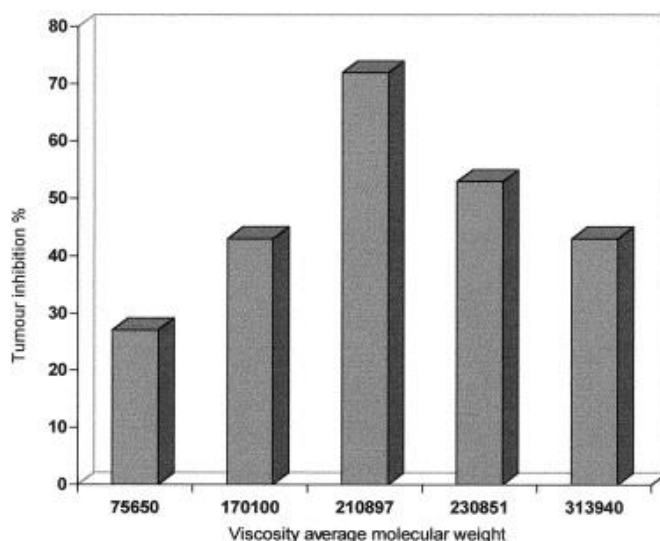
Finalmente, en 2016, Xu et al. observaron un incremento en la proliferación de linfocitos del bazo al ser tratados con levan obtenido desde *Paenibacillus bovis*. Estudiaron de igual forma la variación en la producción de citoquinas y en ello identificaron un notable aumento del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), que es el responsable de la respuesta inmunitaria aguda, promoviendo la movilización de linfocitos T y B, así como inmunoglobulinas y sistema del complemento.

## 6.2. Agente anti-tumoral

Hace más de treinta años, se sugirió por primera vez la posibilidad de que el polisacárido levan actuase como un agente anti-tumoral (Leibovici et al., 1986). Aquellos experimentos demostraron que la presencia de levan aumentaba la actividad de linfocitos B para controlar el tamaño y proliferación del tumor. Sin embargo, otros experimentos

posteriores mostraron resultados contradictorios, y, por tanto, esta posibilidad no está del todo clara.

Posteriormente, en el año 2000, se realizó una aproximación más precisa, donde Calazans et al. (2000) usaron levan procedente de *Z. mobilis* para tratar células de Sarcoma 180. En su trabajo vieron el efecto del peso molecular del polímero, utilizando un amplio rango de pesos moleculares y midiendo el peso del tumor para cada caso. Los resultados (figura 1.18) mostraron que la mayor actividad antitumoral se consigue con levan cuyo peso molecular oscila entre 400 y 500 kDa. El porcentaje de inhibición se mueve entre el 25% y el 75% dependiendo del peso molecular.



**Figura 1.18: Inhibición del crecimiento de tumores según el peso molecular del biopolímero. Fuente: Calazans et al. (2000)**

Estos resultados fueron corroborados por Yoon et al. (2004), utilizando células hepáticas y gástricas, obteniendo valores de inhibición entre el 38% y el 68%, y cuyo mejor rango para inhibición era, en esta

ocasión, entre 600 y 800 kDa. Estos autores también valoraron el efecto de la ramificación (*branching*) en la inhibición, concluyendo que, a más ramificación, mayor inhibición del crecimiento conseguida.

Algunos estudios más recientes han reforzado esta idea, utilizando derivados funcionalizados del polímero. Por ejemplo, Abdel-Fattah et al. (2012) demostraron que la sulfatación del polímero mejora la inhibición de tumores en células hepáticas, y Liu et al. (2012) demostraron que la fosforilación mejora también el rendimiento en el caso de las células tumorales gástricas.

Actualmente los esfuerzos de la comunidad científica se centran en descubrir qué mecanismos están siendo alterados por el polímero, para adquirir dicho comportamiento anti-tumoral (Sarilmiser y Öner, 2014). Hasta el momento, parece claro que es un proceso mediado por apoptosis; mientras que no está claro qué caspasas están involucradas en el proceso. Independientemente del mecanismo de acción, está demostrada la capacidad del polímero levan como agente anti-tumoral en varias líneas celulares (gástrica, hepática, o sarcoma).

### **6.3. Agente anti-oxidante**

Otro de los posibles usos de este polímero es su capacidad para actuar como anti-oxidante por su habilidad para reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en células tumorales de hígado HepG2 (Abdel-Fattah et al., 2012). Estos autores además



demonstraron un incremento en la capacidad anti-oxidante cuando se trabaja con la modificación sulfatada del polímero.

Posteriormente, Esawy et al. (2013) y Dahech et al. (2013) encontraron por separado, la explicación biológica a este fenómeno. Concretamente, se observa un incremento en la expresión de la glutatión-S-transferasa, y un incremento en la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. Todas estas enzimas están involucradas en la conservación del estrés oxidativo de la célula.

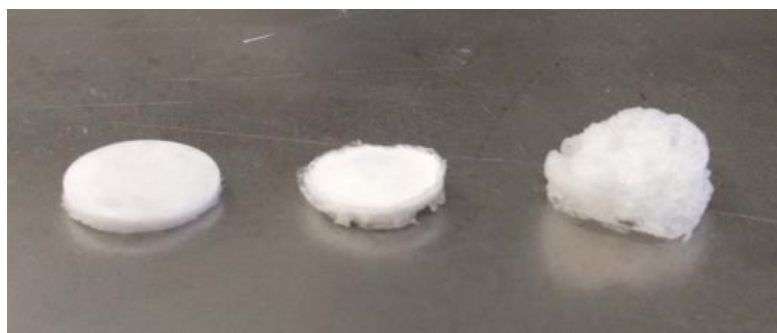
Por estas razones, se ha formulado la posibilidad de utilizar el levan como posible protector de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como la aterosclerosis o el hipercolesterolemia. El estudio publicado por Dahech et al. (2013) muestra una reducción importante de la cantidad de triglicéridos totales en ratas hipercolesterolémicas cuando son alimentadas con levan.

#### **6.4. Soporte para proliferación celular**

La resistencia a la tracción del polímero y su capacidad para no hincharse (*swelling*) sugieren su utilización como posible soporte (*scaffold*) para el crecimiento y proliferación de células. Sin embargo, esta posibilidad no ha sido completamente estudiada, teniendo solamente constancia de dos trabajos importantes con este fin. En primer lugar, Erginer et al. (2016) demostraron que el levan sulfatado (obtenido desde *Halomonas*) es un buen material para proliferación celular en tejido

cardiaco, debido a que tiene propiedades anticoagulantes, semejantes a la heparina.

En segundo lugar, nuestro grupo de investigación (Tabernero et al. (2019)) ha probado que el polímero *levan* puede introducirse en membranas mediante inversión de fase con CO<sub>2</sub> supercrítico para modificar tanto propiedades mecánicas como biológicas de diferentes membranas. En la figura 1.19 se muestra la variación en la forma de la membrana cuando se añade la dispersión coloidal del polímero.



**Figura 1.19. Membranas con diferentes concentraciones de biopolímero introducido (0, 20 y 50% respectivamente). Fuente: Tabernero et al. (2019).**

## 6.5. Prebiótico

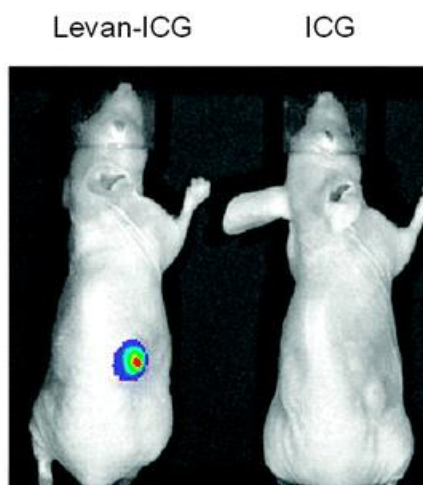
Los fructooligosacáridos (FOS), formados a partir de residuos de fructosa, han sido desde hace mucho tiempo, identificados y usados como prebióticos, es decir, sustancias que son capaces de estimular el crecimiento de diferentes poblaciones bacterianas en el tránsito intestinal (Markowiak y Slizewska, 2017). Yang et al. (2015a, 2015b) estudiaron si también el *levan* podría ser tratado como prebiótico y demostraron que éste podría evitar la adhesión de *Escherichia coli* enterotoxigénica a la

mucosa intestinal, generando cambios en las poblaciones microbianas. Además, Adamberg et al. (2015) demostraron que el polímero levan puede cambiar las proporciones relativas de bacterias en el tracto, provocando un incremento de bacterias de los géneros *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Lactobacilli*. El primero de los géneros ha sido identificado como el mejor hospedador humano por sus propiedades anti-inflamatorias, mientras que segundo y tercero son los clásicos géneros aumentados cuando se alimentan con prebióticos. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha no son suficientes, y se necesitan más esfuerzos para tratar de elucidar el mecanismo por el cual este polímero modifica sustancialmente la microbiota.

## **6.6. Producción de sistemas de liberación controlada de fármacos**

Los sistemas de liberación controlada de fármacos son una de las líneas de investigación más prometedoras y explotadas en nanobiotecnología. Los sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés, *drug delivery systems*), están habitualmente formados por un transportador, que suele ser un polímero, y la sustancia o fármaco, que debe ser liberada de forma controlada. Debido a que estos sistemas van a ser introducidos en el cuerpo humano, el polímero a usar debe ser biocompatible y biodegradable. Durante los últimos años, los polisacáridos han ganado importancia como transportadores para formar estos sistemas, debido a su origen natural y sus similitudes con las biomoléculas presentes en los organismos vivos (Urely et al., 2011).

Actualmente, el levan es el principal polisacárido constituido por fructosas que se ha usado para este fin. La utilización de un polímero basado en fructosas (furanosas) ofrece ciertas ventajas frente a los polímeros tradicionales, compuestos por piranosas. La principal de esas ventajas está relacionada con la sobre-expresión en algunas líneas tumorales (hígado, mama y colon) del transportador GLUT5, de tal forma que puede existir un direccionamiento específico hacia esos tumores (Kim et al., 2015). En la figura 1.20 se muestra cómo en ratas tratadas tras 48 horas, se mantiene la observación de un marcador tumoral cuando ha sido encapsulado en una nanopartícula de levan.



**Figura 1.20: Efecto de la encapsulación de ICG (Indocyanin Green) en la detección de tumores. Comparación frente al tratamiento en forma libre. Fuente: Kim et al. (2015).**

Además de esto, lo más destacable de este polímero es su capacidad para auto-ensamblarse en agua, formando estructuras esféricas que exponen las secciones hidrofílicas de las cadenas hacia el exterior, y dejan un espacio hidrofóbico hacia el interior. De esta forma, son capaces de formar nanocápsulas por sí mismas, una vez que se alcanza la concentración crítica que supone un cambio de polaridad del medio

(Renuart y Viney, 2000). Superada esa concentración, es energéticamente más estable la formación del coloide que la presencia como cadenas aisladas. Por tanto, con este polímero pueden generarse nanopartículas mediante un simple mezclado de componentes en un solvente. El polímero es capaz de reorganizarse en agua y en dimetilsulfóxido (DMSO). Esta posibilidad ya ha sido explorada por algunos autores, presentando aplicaciones de este polímero como un sistema de liberación controlada.

Entre los ejemplos más destacables están las partículas producidas por Demir Sezer et al. (2015), donde se retuvo el antibiótico vancomicina con un rendimiento de encapsulación entre el 45% y el 75%, y un tamaño de partícula entre 400nm y 1.3  $\mu$ m. El valor de la carga superficial (Zeta potencial) se situaba entre 4 y 6.5 mV, observándose algunos fenómenos de agregación con el paso del tiempo. Estos autores también retuvieron la proteína BSA, obteniendo partículas entre 200 y 540 nm con un rendimiento de carga entre el 50% y el 70%, y cargas superficiales semejantes a las anteriores (Demir Sezer et al., 2011). Finalmente, es destacable el trabajo publicado por Kim et al. (2015) donde se encapsuló el marcador indocianina verde, que es capaz de identificar específicamente las células tumorales. De esta forma se pudo identificar células tumorales de mama, por interacción específica con el transportador GLUT5. Estas partículas ofrecían un tamaño entre 150 y 200 nm. Estos tamaños resultan ideales para una administración sistémica, pues son lo suficientemente grandes como para no ser fagocitadas, y lo suficientemente pequeñas para no generar problemas de circulación sanguínea como trombos (Hoshyar et al., 2016).

Otra ventaja de utilizar *levan* para generar sistemas DDS es la posibilidad de realizar ingeniería de modificación superficial de las partículas, aunque ésta no ha sido apenas abordada. Se ha comprobado la posibilidad de incorporar grupos aldehídos mediante reacción de oxidación con peryodato, lo que sugiere que también se podrían incorporar otros grupos funcionales a los residuos hidroxilos de la molécula de fructosa (Sarilmiser y Öner, 2014). La modificación de grupos funcionales en otros más reactivos (aldehídos o ácidos) resulta de gran interés porque permitiría la unión de ciertos fármacos por enlace covalente, reforzando la carga.

Relacionado con la producción de partículas para liberación controlada, es destacable la capacidad del polímero *levan* de actuar como agente de recubrimiento o de reducción para ciertos metales. Esta opción ha sido explorada por algunos autores. Kim et al. (2016) recubrieron partículas de óxido de cerio con *levan*, y observaron un incremento de la actividad antioxidante, reduciendo considerablemente la cantidad de especies reactivas de oxígeno. Bondarenko et al. (2016) utilizaron *levan* para recubrir partículas de hierro, selenio y cobalto. Las nanopartículas obtenidas tienen un tamaño entre 150-200 nm, con valores de polidispersión entre 0.2 y 0.3; y los efectos celulares demuestran que mejoran el metabolismo celular. Finalmente, es destacable el trabajo de Ahmed et al. (2014), que utilizaron *levan* para generar nanopartículas por reducción de sales de plata y oro, que fueron usadas de forma satisfactoria como catalizadores en la reducción de otros compuestos.

## **6.7. Producción de films**

Diversos trabajos han explorado la posibilidad de utilizar *levan* para producir films con diferentes usos. Un ejemplo destacable es el trabajo de Barone y Medunets (2007) donde, el polímero *levan* es mezclado con glicerol y extruido para producir un film con un buen grado de plasticidad para fines biológicos. Sin embargo, la extrusión debe realizarse a elevada temperatura, lo que compromete la implantación del proceso.

Otro trabajo reseñable relacionado con esta aplicación fue presentado por Chen et al. (2014) que crearon un film utilizando *levan* y montmorillonita. Los grupos hidroxilo de *levan* se unieron a los oxígenos superficiales del mineral, generando estabilidad termal y un incremento en la temperatura de transición vítrea. También se observó un aumento importante en el módulo de Young (directamente proporcional a la resistencia mecánica), hasta un 480% con respecto al polímero solo. La imagen del film creado se muestra en la figura 1.21.



**Figura 1.21: Film obtenido de la combinación de *levan* con montmorillonita. Fuente: Chen et al. (2014)**

Finalmente, la solidificación del levan ha sido abordada recientemente por dos publicaciones. Por un lado, Benigar et al. (2016) observaron que el DNA tiene un papel importante en la solidificación del levan y le confiere estructura compacta, sugiriendo la posibilidad de crear geles de levan que contuvieran DNA para el mantenimiento de la estructura y la sustancia que se desee retener. Por otro lado, Osman et al. (2017) demostraron que es posible generar un gel de levan termo sensible, al ser modificado con pNIPA (N-isopropil acrilamida), para la liberación controlada de 5-ASA (ácido 5-amino salicílico).







# Capítulo 2

---

## Objetivos



El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es el estudio y caracterización de un polisacárido formado por fructosas (levan), así como su potencial aplicación en biomedicina. Para alcanzar este objetivo general, se plantearán y desarrollarán los siguientes **objetivos específicos**:

- En primer lugar, se realizará el estudio bioinformático de la enzima (proteína) encargada de la producción de levan. Se buscará conocer su homología de secuencia con otras proteínas, identificar sus regiones de conservación, así como la existencia o no de péptidos señal en la molécula, y una secuencia consenso de los mismos. Este estudio permitirá clasificar filogenéticamente a las especies atendiendo a la expresión de esta enzima levan-sacarasa.
- Seguidamente, se estudiará la producción de levan mediante la aproximación clásica basada en la producción microbiana del mismo. Se utilizarán dos especies que no han sido descritas previamente en la bibliografía. Se estudiará la producción, y se procederá a la caracterización físico-química del polímero obtenido. Se caracterizarán además, las nanopartículas obtenidas por auto-ensamblado atendiendo a su tamaño, carga superficial, estabilidad, así como las condiciones para que se produzca dicho auto-ensamblado. Con los datos de producción se podrán determinar también parámetros de la cinética para ambas especies.
- Con el fin de estudiar una aproximación del proceso de producción que pudiera reducir los costes, se evaluará el uso de fuentes alternativas de nitrógeno para la obtención de este polímero

(basadas en residuos de la industria alimentaria), que será acompañado de un breve estudio económico que analice la viabilidad del proceso y la reducción de costes asociada.

- Una vez estudiada la producción bacteriana, se procederá a la adquisición de la enzima comercial, y con ella, al estudio de la producción del polímero con la enzima aislada, en un reactor de tanque agitado. Al igual que en el caso de la producción microbiana, se caracterizará el polímero obtenido, así como las nanopartículas que éste produce, y su proceso de auto-ensamblado.
- Dado que existen muchos parámetros que condicionan la reacción enzimática, otro objetivo específico de la tesis constituye el estudio de la influencia de dichos parámetros (sustrato, temperatura, proporción enzima-sustrato, elicitores, etc.) en la producción del polímero, así como en las nanopartículas que desde él se obtienen.
- Con los datos anteriores se elaborará un modelo matemático, que caracterice tanto el proceso de producción de levan, el efecto de estos parámetros, como el proceso de auto-ensamblado, con la consiguiente estimación de parámetros, ajustando los resultados experimentales, para determinar las constantes que están involucradas en el proceso.
- Debido al elevado coste de la enzima, se planteará la inmovilización de la enzima en soportes para su reciclado, y por tanto, el trabajo con reactores heterogéneos en lugar de homogéneos. Se estudiará la inmovilización de la enzima en dos soportes diferentes (lecho poroso constituido por perlas de alginato, y reactor monolítico),

cuantificando la producción, así como el efecto de ciertas variables de operación en el sistema. De igual modo, se planteará un modelo de transferencia de materia, que permita determinar las principales constantes de transferencia, así como una mejor comprensión del proceso para un potencial escalado a volúmenes mayores, optimizando la producción tanto tecnológicamente como económicamente.

- Las propiedades del polímero levan, tales como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad para formar nanopartículas en agua, por auto-ensamblado, lo convierte en un material con potencial para su uso en biomedicina, especialmente, en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos. Para ello, se retendrá en dichas nanopartículas un fármaco quimioterápico y se validará su eficacia en el control de la proliferación de las células tumorales mediante cultivos *in vitro*.
- Por otro lado, se ha comprobado la capacidad del polímero de actuar como agente reductor de sales de metales nobles. Esta propiedad será usada para la creación de un sistema nanoparticulado, formado por el propio polímero y el metal plata, generando un sistema con potencial bacteriostático. Se estudiará la síntesis de las partículas, así como la creación de un gel que genere una liberación controlada de fármacos. De esta forma se podrá controlar la dosis y se evitarán algunos efectos adversos del uso de este metal. La liberación de las nanopartículas del gel, así como su efecto bacteriostático será modelado con la construcción de un modelo matemático que permitirá una mejor comprensión y optimización del proceso.

- Finalmente, se analizará su potencial como adhesivo para el recubrimiento de superficies. Concretamente, se validará el polímero levan como un polímero de recubrimiento en prótesis de titanio, utilizadas en traumatología y ortopedia. Se caracterizará el recubrimiento, la adhesión superficial y la capacidad de prevenir la adhesión de bacterias patógenas sobre la prótesis. Esto último será estudiado al analizar el crecimiento de colonias en una placa con la prótesis después de ser expuesta a alta concentración de dichas bacterias. Estos resultados reducirían considerablemente el rechazo de las prótesis y la contaminación de las mismas.







# **Capítulo 3**

---

**Estudio bioinformático de la  
evolución de la enzima levan-  
sacarasa**



## **1. INTRODUCCIÓN. LA ENZIMA LEVAN-SACARASA**

Como se ha comentado previamente, el levan es producido por una enzima llamada levan-sacarasa, presente en diferentes bacterias, que cataliza la hidrólisis del dímero sacarosa en glucosa y fructosa, para continuar con la polimerización de las fructosas obtenidas por enlace  $\beta$  (2-6) desde un aceptor inicial, que suele ser una hexosa (glucosa en la mayoría de ocasiones).

Estas enzimas son extracelulares y en muchos casos, las especies bacterianas contienen solamente un único gen para esta enzima, donde el operón suele estar situado en primera posición dentro del gen. Sin embargo, la información aún es reducida y no se tienen muchos datos acerca de la estructura y la región reguladora del promotor, con la excepción de *Bacillus subtilis*, en el cual se ha descrito que el operón es regulado por un sistema anti-terminación inducible por sacarosa (Crutz et al., 1990). Esta ausencia de información supone un impedimento para seguir mejorando el rendimiento de esta enzima mediante técnicas recombinantes.

La enzima levan-sacarasa es sintetizada principalmente en el citoplasma y se acumula en el periplasma, donde adopta la conformación final como paso previo a la secreción extracelular. Existen enzimas que son liberadas directamente al medio extracelular, mientras que otras pueden permanecer unidas a la pared celular. La ruta de secreción utilizada aún no está completamente clarificada. Parece

claro que la mayoría de las bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas presentan un péptido señal para la secreción, siguiendo un mecanismo o ruta de secreción conocido como “*Sec-type*”. Sin embargo, como se demostrará en las siguientes secciones, hay otras bacterias que carecen de péptido señal, lo que implicaría la existencia de otra ruta posible (Arrieta et al., 2004).

La enzima levan-sacarasa está presente de forma constitutiva principalmente en aquellos géneros de bacterias que viven en presencia de abundante sacarosa, tales como *Actinomyces*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Zymomonas*, etc. En otros géneros que suelen ocupar otros hábitats, su expresión viene mediada por un inductor, que suele ser en muchas ocasiones, sacarosa. En algunos casos incluso, el sistema está reprimido por la presencia de glucosa (Menéndez et al., 2009).

## **2. MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO BIOINFORMÁTICO**

Con el objetivo de estudiar la expresión de la enzima, su homología a nivel de secuencia entre las diferentes especies, así como la identificación de péptidos señal o regiones conservadas, se procedió a la búsqueda y obtención de las secuencias proteicas desde las bases de datos disponibles.

Todas las secuencias de proteínas para el estudio fueron obtenidas por comparador BLASTP con la base de datos de secuencias de proteínas no-redundantes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las cepas bien caracterizadas de *B. subtilis* y *Z. mobilis*.

Se seleccionaron cepas que cumplieran más del 90% de similitud en la secuencia y alta homogeneidad funcional. Posteriormente, el alineamiento múltiple de proteínas se realizó utilizando el soporte del Instituto europeo de bioinformática conocido como Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/services>).

De igual modo, el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante el algoritmo HMMER basado en modelos ocultos de Markov. Desde dicho alineamiento, fueron construidos los árboles filogenéticos utilizando el software FastTree 2.1.4. siguiendo el método de máxima probabilidad (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>), basado en el algoritmo de *Neighbour-Joining* (Price et al., 2009).

Los datos obtenidos para los árboles filogenéticos fueron tratados por el software iTOL (interactive Tree of Life) (<http://itol.embl.de/upload.cgi>) para la construcción de las imágenes que se exponen a continuación en el capítulo.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Obtención y análisis de las secuencias

En primer lugar, se agruparon por géneros las secuencias de las especies encontradas tras el primer alineamiento de secuencias frente a las referencias de *Z. mobilis* y *B. subtilis*. En total, fueron identificadas 684 especies de bacterias que contenían completamente secuenciada la enzima. Todas ellas presentaban un grado de identidad elevado con un E-valor inferior a  $10^{-10}$ . Esto asegura que la alta tasa de coincidencia no es fruto de la casualidad, y es posible concluir que estamos ante la misma proteína, pero en un organismo diferente.

En total, se detectaron 107 géneros diferentes de bacteria, de las cuales 61 pertenecían a la familia de las Gram negativas, y 46 eran Gram positivas. Los géneros encontrados que presentaban un mayor número de especies con la enzima secuenciada fueron: *Actinomyces* (8 especies), *Bacillus* (27), *Burkholderia* (20), *Gluconobacter* (9), *Lactobacillus* (14), *Novosphingobium* (12), *Paenibacillus* (20), *Pseudomonas* (28), *Sphingomonas* (12) y *Streptomyces* (13).

En la Tabla 2.1. se muestran los géneros de bacterias con la enzima secuenciada, indicando el número de especies detectadas para cada género, así como la presencia o no de péptido señal.

**Tabla 2.1. Géneros de bacteria con enzima levan-sacarasa secuenciada**

Género	Nº especies detectadas	Gram +/-	¿péptido señal?	Género	Nº especies detectadas	Gram +/-	¿péptido señal?
<i>Acetobacter</i>	2	-	NO	<i>Halorubrum</i>	9	-	NO
<i>Acinetobacter</i>	2	-	NO	<i>Halostagnicola</i>	2	-	NO
<i>Actinomyces</i>	14	+	SI	<i>Haloterrigena</i>	3	-	SI
<i>Agromyces</i>	2	+	SI	<i>Herbidospora</i>	5	+	NO
<i>Alteribacillus</i>	1	+	SI	<i>Kibdelosporangium</i>	1	+	NO
<i>Altererythrobacter</i>	2	-	NO	<i>Komagataeibacter</i>	2	-	NO
<i>Anaerobacillus</i>	1	+	SI	<i>Kozakia</i>	1	-	NO
<i>Arsenophonus</i>	3	-	NO	<i>Lactobacillus</i>	24	+	SI
<i>Arthrobacter</i>	40	+	SI	<i>Lechevalieria</i>	1	+	NO
<i>Asaia</i>	2	-	SI	<i>Leuconostoc</i>	5	+	SI
<i>Azotobacter</i>	3	-	SI	<i>Leuconostocaceae</i>	1	+	NO
<i>Bacillus</i>	58	+	SI	<i>Lonsdalea</i>	1	-	NO
<i>Beijerinckia</i>	1	-	SI	<i>Marinobacterium</i>	1	-	SI
<i>Blastomonas</i>	6	-	NO	<i>Microbacterium</i>	8	+	NO
<i>Brachybacterium</i>	2	+	SI	<i>Microbispora</i>	2	+	NO
<i>Brenneria</i>	2	-	NO	<i>Natrialba</i>	3	+	NO
<i>Brevibacillus</i>	2	+	SI	<i>Natronococcus</i>	2	+	NO
<i>Brevibacterium</i>	1	+	SI	<i>Nonomuraea</i>	6	+	NO
<i>Burkholderia</i>	57	-	SI	<i>Novosphingobium</i>	27	-	NO
<i>Candidatus</i>	1	-	SI	<i>Oenococcus</i>	2	+	NO
<i>Thiomargarita</i>				<i>Paenarthrobacter</i>	2	+	NO
<i>Caulobacter</i>	4	-	NO	<i>Paenibacillus</i>	38	+	SI
<i>Cellulomonas</i>	8	+	SI	<i>Paenisporosarcina</i>	1	+	SI
<i>Cellulosimicrobium</i>	1	+	SI	<i>Pantoea</i>	1	-	NO
<i>Clavibacter</i>	2	+	SI	<i>Paraburkholderia</i>	5	-	SI
<i>Clostridium</i>	5	+/-	SI	<i>Pectobacterium</i>	1	-	NO
<i>Cosenzaea</i>	1	-	NO	<i>Phaseolibacter</i>	1	-	NO
<i>Croceicoccus</i>	1	-	NO	<i>Pontibacillus</i>	2	+	NO
<i>Cryobacterium</i>	1	-	SI	<i>Porphyrobacter</i>	7	-	NO
<i>Cupriavidus</i>	2	-	SI				
<i>Deinococcus</i>	1	+	SI	<i>Promicromonosporaceae</i>	1	+	SI
<i>Desulfovibrio</i>	1	-	NO	<i>Pseudoalteromonas</i>	3	+	SI
<i>Domibacillus</i>	1	+	SI	<i>Pseudarthrobacter</i>	5	+	SI
<i>Dyella</i>	1	-	SI	<i>Pseudomonas</i>	77	-	NO

<i>Erwinia</i>	3	-	NO	<i>Rahnella</i>	2	-	NO
<i>Erythrobacter</i>	12	-	NO	<i>Rhodococcus</i>	1	+	NO
<i>Ethanoligenens</i>	1	+	SI	<i>Roseibacterium</i>	1	-	SI
<i>Fictibacillus</i>	3	+	SI	<i>Roseinatronobacter</i>	1	-	NO
<i>Fontibacillus</i>	1	+	SI	<i>Rothia</i>	1	+	SI
<i>Fructobacillus</i>	5	+	NO	<i>Sandarakinorhabdus</i>	1	-	NO
<i>Gibbsiella</i>	3	-	NO	<i>Serratia plymuthica</i>	5	-	NO
<i>Gluconobacter</i>	10	-	NO	<i>Solirubrobacterales</i>	1	+	NO
<i>Haladaptatus</i>	4	-	NO	<i>Sphingobium</i>	15	-	NO
<i>Halalkalicoccus</i>	2	-	NO	<i>Sphingomonas</i>	36	-	NO
<i>Haloarcula</i>	10	-	NO	<i>Sphingopyxis</i>	3	-	NO
<i>Halobacillus</i>	7	+	SI	<i>Sporolactobacillus</i>	3	+	SI
<i>Halobellus</i>	1	-	NO	<i>Streptococcus</i>	20	+	SI
<i>Haloferax</i>	8	+	NO	<i>Streptomyces</i>	15	+	SI
<i>Halogeometricum</i>	3	-	NO	<i>Tanticharoenia</i>	2	-	NO
<i>Halogramum</i>	3	-	NO	<i>Tatumella</i>	4	-	NO
<i>Halohasta</i>	1	-	NO	<i>Terribacillus</i>	3	+	SI
<i>Halomicrobium</i>	3	-	NO	<i>Tolumonas</i>	1	-	SI
<i>Halomonas</i>	1	-	NO	<i>Vibrio</i>	3	-	SI
<i>Halopelagius</i>	2	-	NO	<i>Zymomonas</i>	2	-	NO
<i>Halopenitus</i>	1	-	NO				
<i>Haloprofundus</i>	1	-	NO				

La longitud de la cadena en las enzimas encontradas varía desde los 783 aminoácidos encontrados en *Lactobacillus* hasta los 356 aminoácidos encontrados en *Gibbsiella*. Con respecto a la presencia de péptido señal, fue encontrado mayoritariamente en Gram positivas, donde fue observado en el 65% de las especies mientras que solamente el 23% de las Gram negativas presentaban este péptido señal. Sin embargo, no se pudieron identificar señales que indicaran la presencia de otras vías de secreción para aquellas especies que carecían de péptido señal.

En el caso de aquellas secuencias que presentan péptido señal, el aminoácido Alanina (A) es el que ocupa la posición -1, es decir, el lugar destinado a la acción de la peptidasa señal para la hidrólisis del enlace peptídico, dando lugar a la proteína final. La Alanina es también el aminoácido más encontrado en la posición +1 (en el 37% de las secuencias analizadas). En el resto de las secuencias, hasta 10 aminoácidos diferentes ocupan la primera posición de la secuencia. Atendiendo a la longitud del péptido señal, se observa que en general es mayor en las bacterias Gram positivas (entre 3 y 6 aminoácidos) frente a las Gram negativas (de 2 a 4 aminoácidos).

### **3.2. Alineamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos**

Posteriormente, con el propósito de reagrupar las secuencias basándonos en el origen evolutivo de las mismas, y de los microorganismos que las expresan, se procedió a su alineamiento múltiple, y desde éste, a la construcción de árboles filogenéticos que organicen y expliquen las diferencias más significativas en la secuencia de aminoácidos.

Del alineamiento de las secuencias de las enzimas, junto con alineamiento del genoma completo de las especies estudiadas, se puede construir un árbol filogenético como el que se muestra en la Figura 2.1., donde las 107 especies pueden ser agrupadas en 8 sectores o “*clades*” diferentes. De estos 8 clades, cuatro pertenecen a bacterias Gram

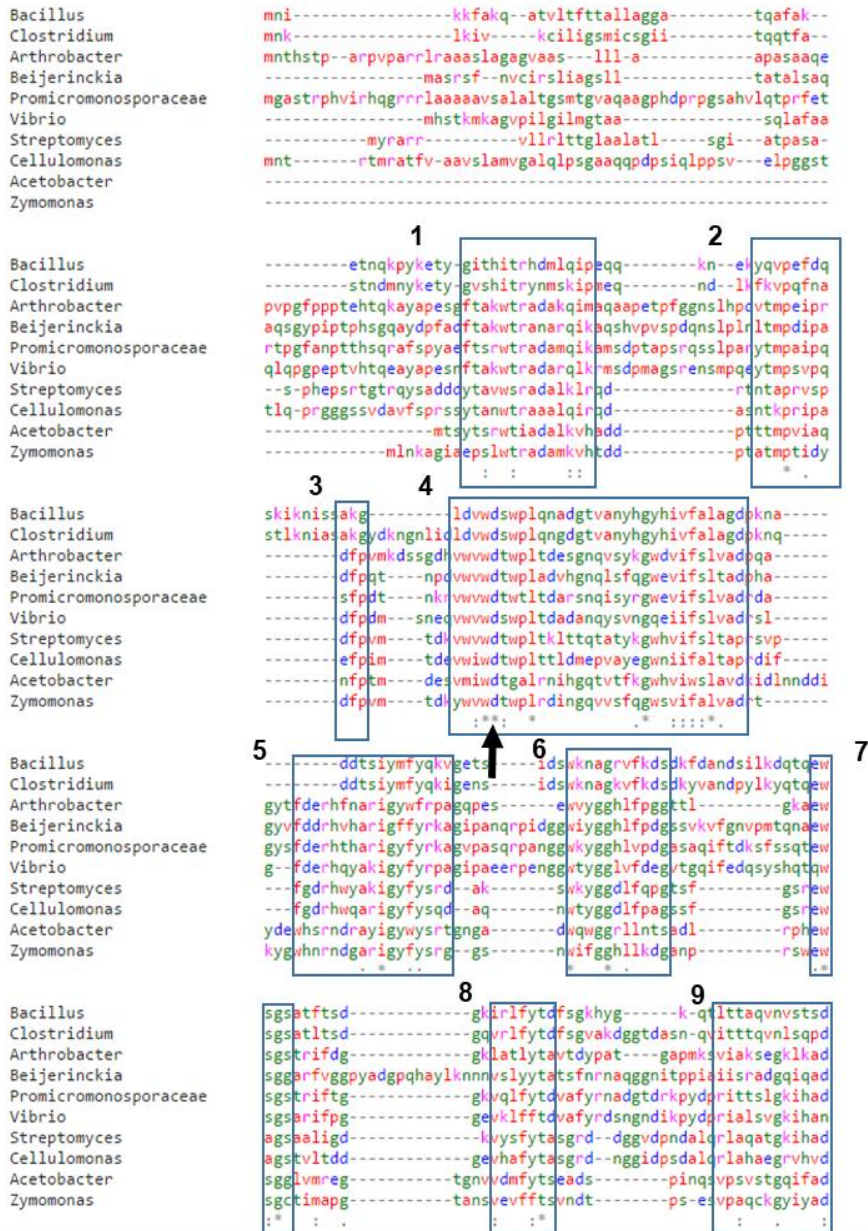


El Clade I tiene tres ramas principales, donde una sola rama tiene la mayoría de las enzimas leván-sacarasas, que todas ellas contienen péptido señal. También en los clades 3, 4 y 5, todos los géneros contienen péptido señal (exceptuando *Paenarthrobacter* en el Clade IV, y *Microbacterium* en el Clade V). Sin embargo, en el Clade II, ninguna de las especies tiene péptido señal, al igual que ocurre en la mayoría de los clades de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, tal y como demostraron Eun-Kyung et al. (2002), la presencia o no de péptido señal no condiciona la cantidad de proteína presente en el periplasma.

Además de lo anterior, del alineamiento de secuencias realizado por medio de Clustal Omega, se desprende una relación entre el tamaño de la proteína y el clade donde ha sido ubicada la especie. Dicho alineamiento demuestra que las leván-sacarasas de los diferentes clades presentan 17 regiones semejantes a lo largo de la secuencia, exceptuando el extremo N-terminal de las proteínas. Dicho alineamiento (1 secuencia seleccionada de cada uno de los Clades antes mencionados) junto con la identificación de las diferentes regiones puede observarse en la Figura 2.2.

Del alineamiento se observa que existen 36 aminoácidos que están completamente alineados en todas las proteínas y 8 de esas regiones contienen más de 14 aminoácidos, siendo regiones amplias y largamente conservadas. Estos resultados van en consonancia con aquellos presentados por Naumoff (1999), donde identificó 2 regiones

consenso que son las siguientes: *VFKMNG-YLF* y *Y-SNS-LGTPYKPLN-KTGLVL*.





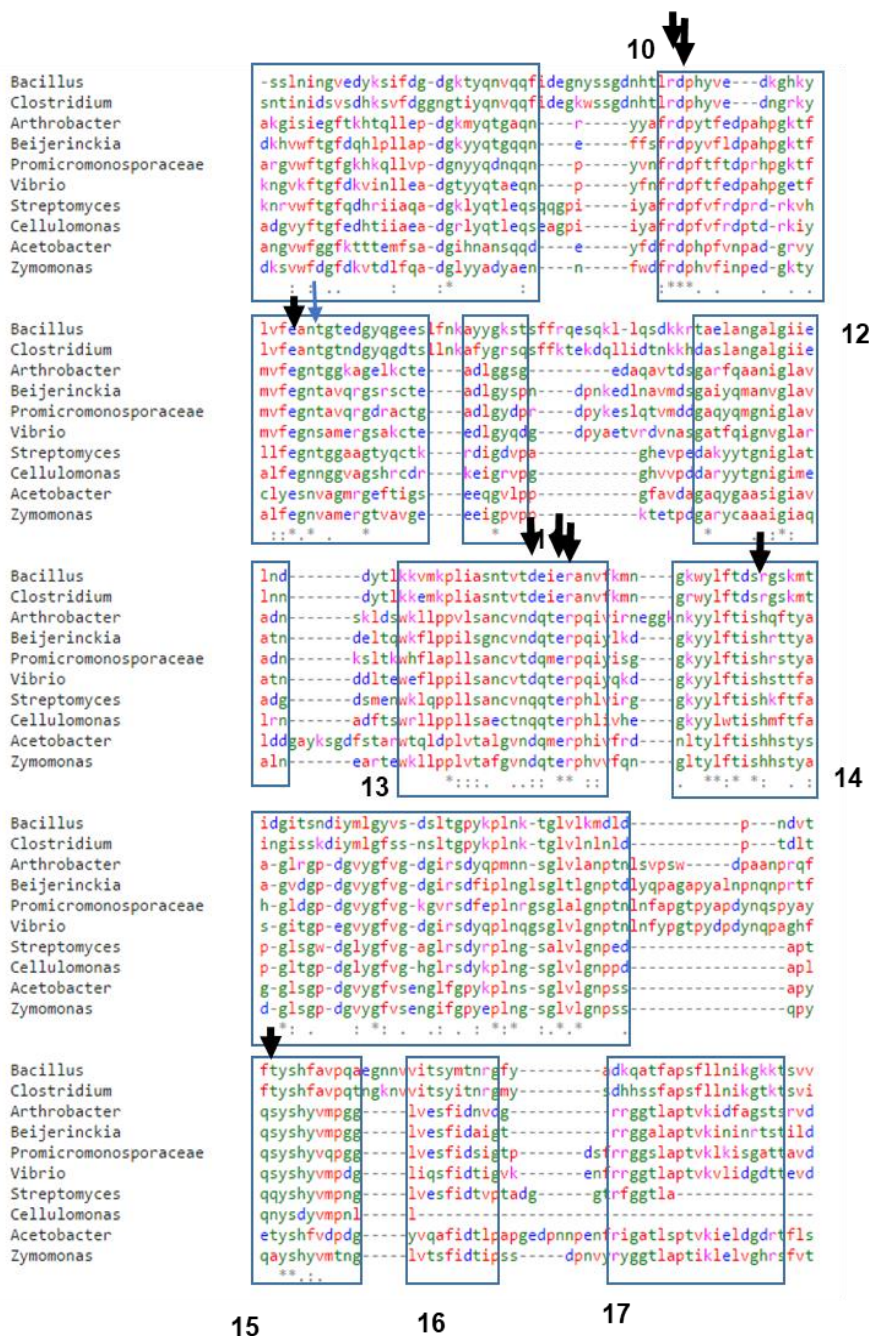


Figura 2.2: Alineamiento múltiple de las regiones semejantes de levansacarosas en bacterias Gram + y Gram -. El origen es siempre el aminoácido metionina. Los asteriscos indican igualdad y los puntos indican cambios conservativos. Las regiones con mayor similitud se encuentran enmarcadas y numeradas por orden.



Dichas secuencias consenso se corresponden con nuestras regiones número 13 y 14. Sin embargo, al haberse tratado más secuencias en este estudio, se han podido identificar nuevas regiones consenso. Además, en las ya propuestas se ha visto una modificación, dado que no cumple en el género *Arthrobacter*, por la presencia de cuatro aminoácidos extra.

De cara a identificar la importancia para la función de la enzima de estas secuencias consenso, varios autores han descrito el centro activo de la enzima en *B. subtilis* (Meng and Fütterer 2003), *B. megaterium* (Strube et al., 2011), *Erwinia amylovora* (Wuerges et al., 2015), y *G. diazotrophicus* (Martinez-Fleites et al., 2005). Los aminoácidos identificados como importantes para el mecanismo de acción en *B. subtilis* son: Asp86, Ser164, Arg246, Asp247, Glu262, Glu340, Glu342, Arg343, Arg360 y Tyr411. Estos aminoácidos aparecen en la mayoría de los géneros analizados, como regiones conservadas (puede observarse en las flechas de la Figura 2.2.).

Las excepciones detectadas en los géneros analizados son *Streptomyces* y *Cellulomonas*, los cuales en la posición 164 la serina es sustituida por la alanina. Por otro lado, el glutámico está solo presente en la posición 340 en los géneros *Clostridium* y *Bacillus*, siendo sustituido por Glutamina en el resto de los géneros. Ambas sustituciones se han considerado conservativas, es decir, que no modifican ni la función ni la estructura secundaria de la enzima. Por el contrario, no se puede considerar como una sustitución conservativa el cambio en el lugar de unión a metales (Thr265) por una valina. Se

encuentra conservado en todas las especies analizadas excepto en *Bacillus* y *Clostridium*. Estos resultados vienen a incrementar aquellos presentados previamente por la bibliografía que se centraban en un grupo mucho más reducido de especies. Por esta razón, se han detectado más cantidad de regiones con alto grado de identidad, lo que sugiere la necesidad de más experimentación y trabajo taxonómico para determinar el papel que cumplen cada una de ellas en la actividad de la enzima.

## **4. CONCLUSIONES**

El estudio bioinformático realizado con más de 100 especies de la enzima levan-sacarasa ha mostrado las regiones más conservadas, y algunas secuencias consenso, que en ciertas ocasiones coinciden con residuos importantes para el mecanismo catalítico de la enzima. Además, se han clasificado las secuencias atendiendo al origen filogenético y se ha identificado el péptido señal en numerosas secuencias, tratando de clarificar el proceso de secreción de la enzima al exterior celular. El incremento de este conocimiento relacionado con las secuencias proteicas facilitará la utilización de técnicas de ingeniería genética en el futuro, que podrán mejorar la eficiencia catalítica, y con ello, obtener mayores rendimientos de producción del polímero.

---

### **Artículo publicado relacionado con el capítulo:**

Levan and Levansucrases: Polymer, enzyme, micro-organisms and biomedical applications. Biocatalysis and Biotransformations 36 (2018), 233-244.



# **Capítulo 4**

---

## **Producción de polifruktosas por vía microbiana**



## 1. INTRODUCCIÓN

Las polifruktosas se obtienen tradicionalmente desde microorganismos, desde hace varias décadas. *Zymomonas mobilis* ha destacado como el principal microorganismo productor de estos compuestos poliméricos. Sin embargo, un problema importante del uso de esta bacteria Gran negativa es que ocurre una producción paralela de etanol, lo cual reduce la pureza en el producto obtenido, y además implica un paso adicional de purificación de las polifruktosas sintetizadas. Otra de las bacterias que ha sido usada ampliamente para la producción de polifruktosas es *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram positiva muy abundante en la naturaleza, y cuya enzima incluso ha conseguido ser aislada con un elevado grado de pureza. Por esta razón, la enzima purificada desde esta bacteria será usada en los siguientes capítulos de esta tesis doctoral. En la última década, están apareciendo nuevos géneros de bacteria que se han visto efectivos para la producción de polifruktosas, como *Hallomonas* o *Pseudomonas* (Poli et al., 2009; Jathore et al., 2012). De acuerdo con la revisión bibliográfica planteada por Srikanth et al. (2015), más de cincuenta especies diferentes han sido descritas como productoras de estas moléculas.

Los estudios publicados hasta el momento con estas bacterias se centraban en optimizar el medio de cultivo, para conseguir mejores rendimientos, tomando en consideración parámetros como el pH, la temperatura, el uso y concentración de los sustratos, etc. Por ejemplo, Ing-Lun et al. (2011) describieron la mejor concentración de sacarosa para la producción, y en otro estudio (2005), estos mismos autores,

analizaron el pH y la temperatura al utilizar *B. subtilis* como especie productora. Sus conclusiones fijaron los parámetros ideales para el crecimiento de estas bacterias y la obtención de polifruktosas: pH ligeramente ácido (5-6), temperatura entre 25°C y 40°C, concentraciones de sacarosa entre 150 y 250 g/L.

Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún trabajo que analice cómo influye la pared de péptidoglicano (Gram positivas o Gram negativas) en la producción de polifruktosas, y a pesar de la existencia de algún artículo relacionado con las cinéticas de producción (Esawy et al., 2008); éstas aún no han sido completamente modeladas desde el punto de vista matemático.

Además, teniendo en cuenta la economía del proceso (elevado valor de las polifruktosas en el mercado), son muchos los esfuerzos que se están realizando en reducir costes. Una alternativa plausible, ya evaluada por de Oliveira et al. (2007), es el uso de fuentes más económicas como sustrato, en sustitución de sacarosa o extracto de levadura comercial, que son de elevado coste. Concretamente, de Oliveira et al., probaron la eficiencia en la obtención de polifruktosas al emplear algunos residuos de la industria azucarera como melazas o siropes de azúcar de caña. Sin embargo, los residuos obtenidos de la industria de la fruta no han sido aún estudiados como alternativa viable, con el objetivo de sustituir al extracto de levadura como fuente de nitrógeno para la obtención de proteínas por parte de los microorganismos.



Por estas razones, a lo largo de este capítulo, se estudiará y comparará la producción de polifruktosas utilizando dos bacterias con diferente composición de pared celular (Gram positiva y Gram negativa); y se evaluará la concentración de sustrato en ambas como factor crucial para la construcción y modelado de las cinéticas bacterianas que regulan el proceso de producción del polímero. Posteriormente, se realizará una caracterización fisicoquímica detallada de las polifruktosas obtenidas por ambas vías, y se estudiarán las nanopartículas producidas en ambos casos, a través del auto ensamblado de estas polifruktosas. Finalmente, se estudiará la posibilidad de utilizar residuos de la industria del zumo de naranja como alternativa al uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

## 2. CRECIMIENTO MICROBIANO Y PRODUCCIÓN DE POLIFRUCTOSAS

### 2.1. Selección de especies y condiciones de cultivo

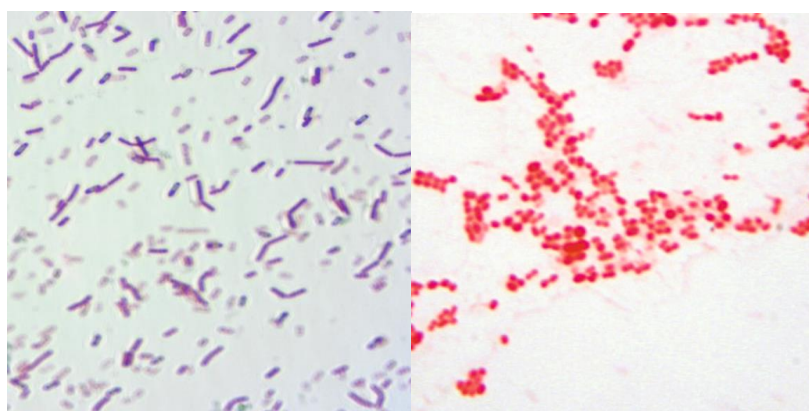
Como se ha mencionado en la Introducción del capítulo, se seleccionaron dos especies diferentes, adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Concretamente se seleccionó *Bacillus atrophaeus* como modelo de bacteria Gram positiva (CECT 0038), y *Acinetobacter nectaris* (CECT 8127) como modelo de bacteria Gram negativa.

*B. atrophaeus* es una bacteria aerobia, productora de esporas, de fenotipo semejante a *B. subtilis*, que ha tenido un papel importante como protector de cultivos, y promotor del crecimiento de ciertas plantas, debido a los metabolitos secundarios sintetizados (Sella et al., 2014).

*A. nectaris* es una bacteria aerobia, que puede soportar bajas concentraciones de oxígeno, catalasa positiva y oxidasa negativa, no formadora de esporas (Álvarez-Pérez et al., 2013). Ha sido aislada del néctar floral de algunas plantas situadas en los alrededores del parque natural de Doñana, en Huelva (España). En la figura 4.1 se muestran las imágenes de ambos tipos de bacterias tomadas por microscopía óptica.

Ambas especies fueron cultivadas en matraces Erlen-Meyer con volumen de cultivo 250 mL, usando el medio de cultivo siguiente como

caso base: 7 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L de hidrógeno fosfato de di-potasio ( $K_2HPO_4$ ), 1.6 g/L de sulfato de amonio ( $NH_4SO_4$ ), 0.4 g/L de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ). Una vez preparado el medio, se ajustó a un rango de pH entre 5.5 y 6 (utilizando ácido clorhídrico 1 M), pues es el valor necesario para que se produzca la secreción de la enzima levan-sacarasa a la pared celular. Los experimentos se llevaron a cabo a 30°C, en incubador cerrado, con velocidad de agitación de 150 rpm.



**Figura 4.1.** Imágenes de microscopía óptica de las bacterias seleccionadas: *B. subtilis* (izquierda) y *A. nectaris* (derecha).

## **2.2. Cuantificación y purificación de biomasa y polifruktosas**

La cuantificación de la biomasa, y por tanto, el control del crecimiento microbiano pueden realizarse por espectrofotometría, al medir la densidad óptica a 600 nm.

Partiendo de masa seca, se resuspendió en medio de cultivo, a diferentes concentraciones conocidas, para la realización de un

calibrado que permitiese estimar la masa de biomasa según las medidas de absorbancia. Las rectas de calibrado se presentan en la ecuación 4.1. para *A. nectaris*, y en la ecuación 4.2. para *B. atrophaeus*; donde la concentración de biomasa está expresada en mg/mL:

$$Abs_{600\text{ nm}} = 0.1091 \cdot C_{biomasa} - 0.0216 \quad (\text{Ec. 4.1.})$$

$$Abs_{600\text{ nm}} = 0.1049 \cdot C_{biomasa} - 0.0089 \quad (\text{Ec. 4.2.})$$

La biomasa fue cuantificada cada 8 horas por espectrofotometría durante las primeras 40 horas, y paralelamente, siguiendo el método propuesto por Vigants et al. (2001), se estimó la cantidad de polifrutosa producida mediante la medida de la absorbancia a 400 nm. Dicho método está fundamentado en la aparición de turbidez en el medio cuando se produce la polimerización de la fructosa (también conocido como efecto Tindall).

Para una correcta determinación, una alícuota del medio de cultivo fue extraída, y centrifugada a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar completamente la biomasa. Posteriormente, el sobrenadante fue medido a 400 nm en el espectrofotómetro, y utilizando el calibrado previamente desarrollado, y presentado en la ecuación 4.3., se puede calcular la concentración de polifrutosa presente, donde dicha concentración viene definida en mg/mL.

$$Abs_{400\text{ nm}} = 0.1645 \cdot C_{polifrutosa} - 0.035 \quad (\text{Ec. 4.3.})$$

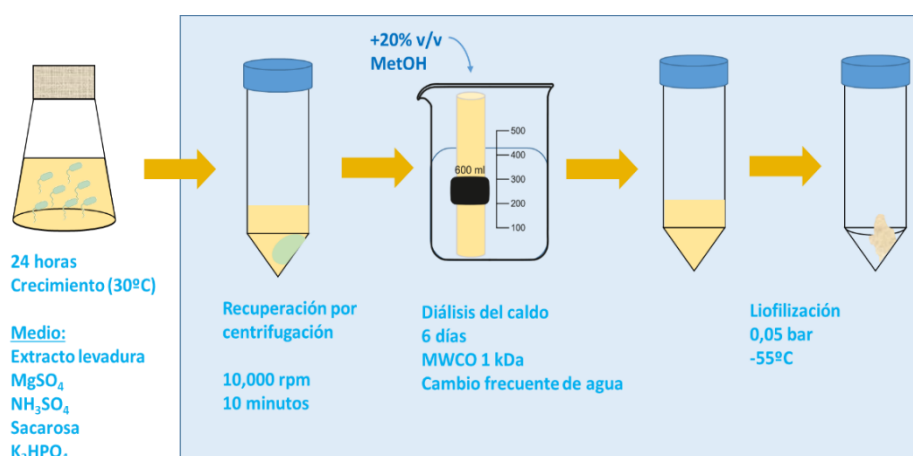
Según Vigants et al. (2003), la cantidad de glucosa consumida se puede calcular desde el cociente de sus pesos moleculares unitarios, como se detalla en la ecuación 4.4.

$$M_{glucosa} = \frac{180}{162} \cdot M_{polifruktosa} \quad (\text{Ec. 4.4.})$$

Finalmente, el aislamiento del polímero debe realizarse cuando el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria. Para ello, la biomasa es recogida y separada del medio mediante centrifugación (al igual que se hacía con las alícuotas cada 8 horas) a 10,000 rpm durante 10 minutos. Como el polisacárido es secretado al medio de cultivo, la biomasa es descartada, o en su caso, utilizada para subsiguientes cultivos; y se busca la extracción del polímero desde el sobrenadante.

Sin embargo, la eficiencia de la centrifugación puede provocar la presencia de una pequeña cantidad residual de bacterias en el sobrenadante, hecho que no sería deseable, dados los criterios de esterilidad buscados para estas moléculas. Además, el sobrenadante contiene otras moléculas sobrantes del medio de cultivo, que tienen que ser separadas de la polifruktosa. Por esta razón, con el objetivo de eliminar otros componentes del medio de cultivo, y evitar la propagación de las bacterias residuales de la centrifugación, el sobrenadante es dializado durante 6 días con membranas de corte de peso molecular 1 kDa, con cambio de agua cada 24 horas. Para evitar que exista la proliferación bacteriana desde las bacterias residuales de la centrifugación, se añade metanol al sobrenadante, hasta una concentración de metanol del 20% (v/v), que garantiza que no se

producirá crecimiento microbiano. Una vez terminada la diálisis, el contenido de la bolsa de diálisis es congelado, para posteriormente ser secado, en un liofilizador *Telstar* trabajando a  $-55^{\circ}\text{C}$  y 0.050 bar de presión. De esta forma, se eliminará todo el agua presente en la mezcla, resultando las polifruktosas secas, disponibles para ser caracterizadas. En la figura 4.2 se muestra un esquema del procedimiento seguido hasta la consecución de la masa de polifruktosa seca.



**Figura 4.2. Esquema del proceso de purificación de la polifruktosa obtenida de forma enzimática.**

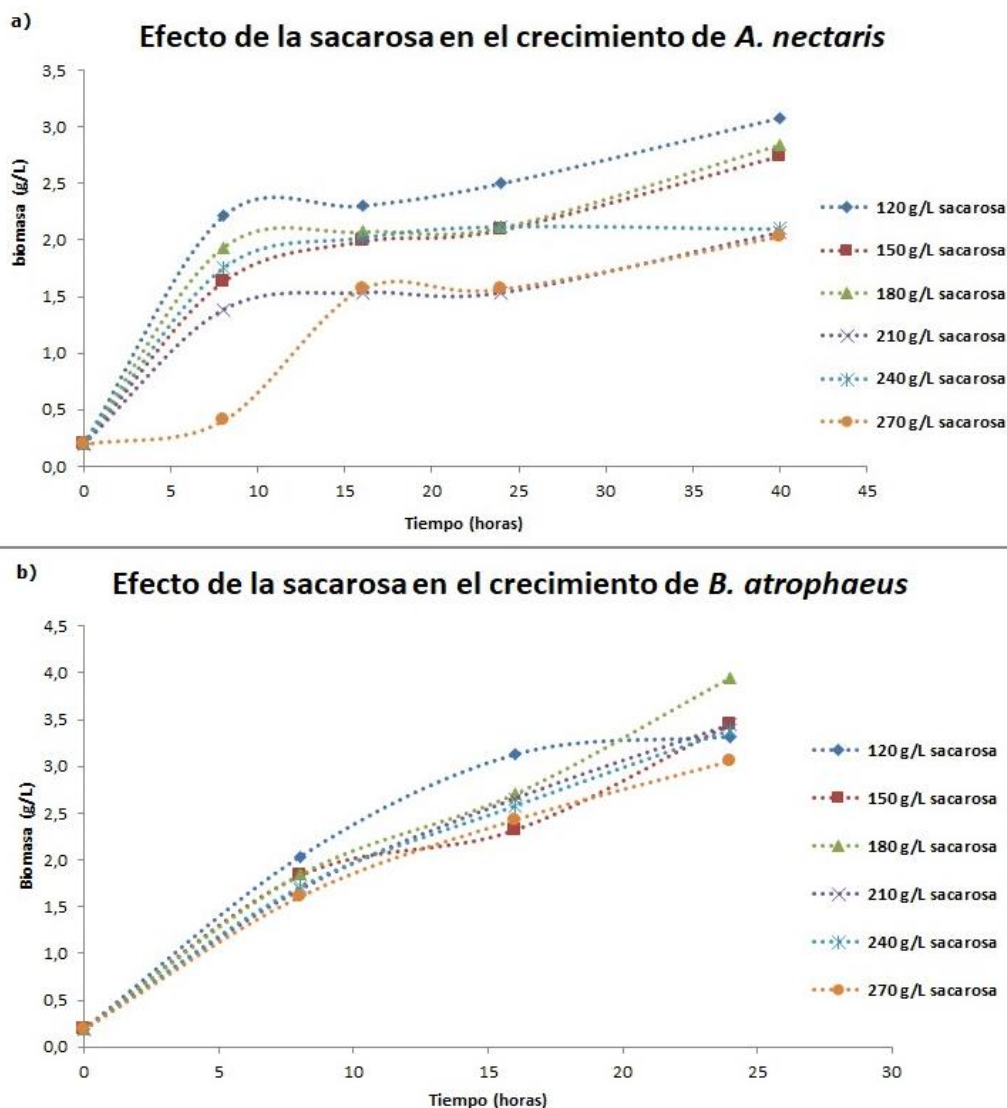
### 2.3. Influencia del sustrato en el crecimiento microbiano y en la producción de polifruktosas.

Con el fin de conocer la influencia del sustrato en cada uno de los dos tipos de bacterias, se ensayaron diferentes concentraciones iniciales de sacarosa en el medio de cultivo (120, 150, 180, 210, 240, 270 g/L). Este rango de concentraciones ha sido descrito previamente

como óptimo para la producción en otras especies descritas en la literatura para este fin (Ing-Lung et al., 2011).

Se tomaron medidas cada 8 horas (durante las primeras 40 horas), y los resultados del crecimiento para ambas especies se encuentran representados en las gráficas de la Figura 4.3., donde el gráfico a representa el crecimiento de *A. nectaris*, y el gráfico b representa el crecimiento de *B. atrophaeus*.

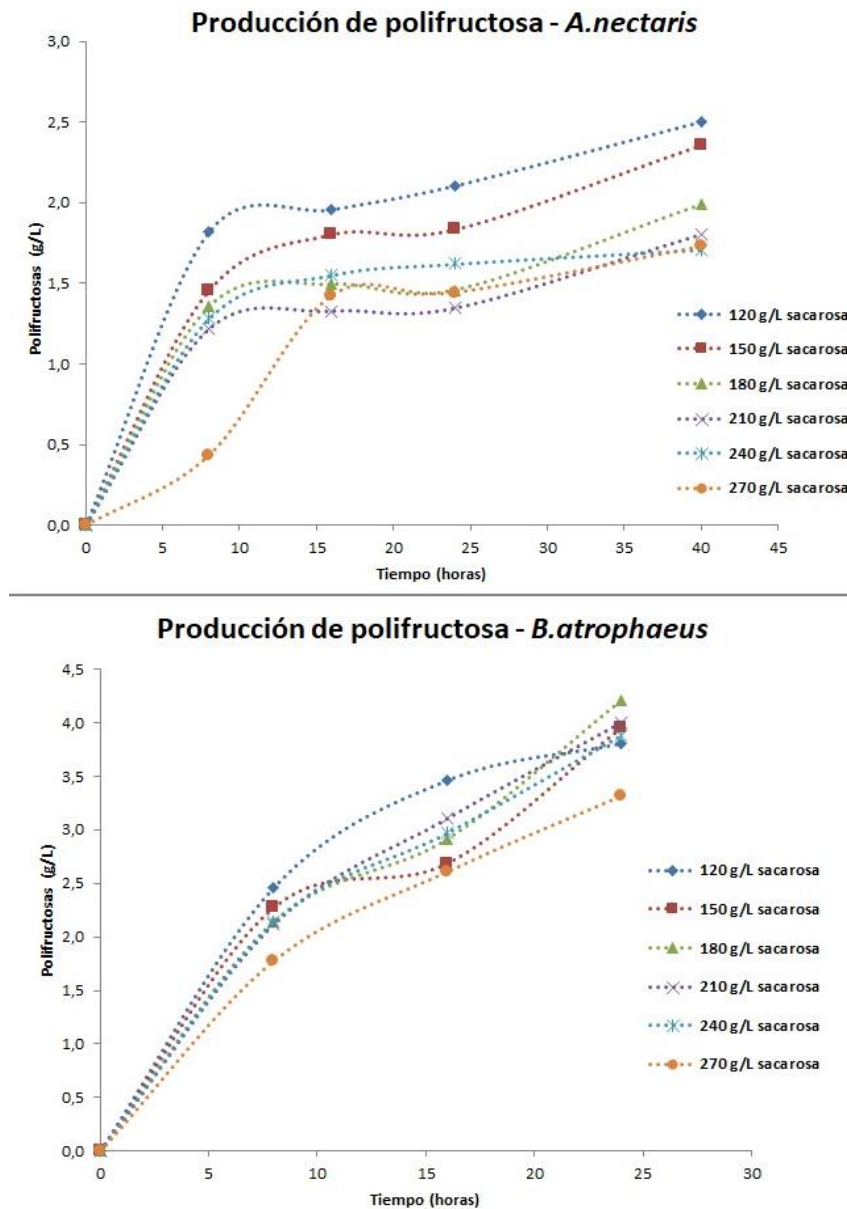
En la figura 4.3. se puede observar cómo la sacarosa tiene efecto de inhibidor en el caso de la bacteria Gram negativa (4.1a), mientras que no parece tener mucho efecto en el crecimiento de las bacterias Gram positivas (4.1b). En el caso de *A. nectaris*, se observa una reducción en la biomasa producida a las 36 horas, pasando de 3 g/L a 2g/L para los casos de las más altas concentraciones. De igual modo, *B. atrophaeus* tiene un mejor uso del sustrato, dado que es capaz de crecer hasta obtener 4 g/L en ese mismo intervalo de tiempo. De esta forma, se establece la concentración de 120 g/L de sacarosa inicial como ideal para el caso de *A. nectaris*, y 180 g/L para el caso de *B. atrophaeus*, aunque las diferencias no pueden ser consideradas significativas.



**Figura 4.3.** Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento de dos especies bacterianas: a) *A. nectaris* y b) *B. atrophaeus*

La producción de polifruetosa también fue determinada cada 8 horas por espectrofotometría, y su evolución está representada en los gráficos presentes en la Figura 4.4., donde el gráfico a representa la producción del polímero en *A. nectaris*, y el gráfico b representa la producción del polímero en *B. atrophaeus*.





**Figura 4.4.** Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de polifruktosa desde: a) *A. nectaris* y b) *B. atrophaeus*

En ella se puede observar, que en ambos casos se manifiesta la misma tendencia. La producción de polifruktosas en *A. nectaris* decrece a medida que se incrementa la concentración de sacarosa

(pasando de 2.5 g/L de polímero producido con 120 g/L de concentración de sacarosa, hasta 1.5 g/L de polímero, cuando la sacarosa inicial alcanza los 270 g/L).

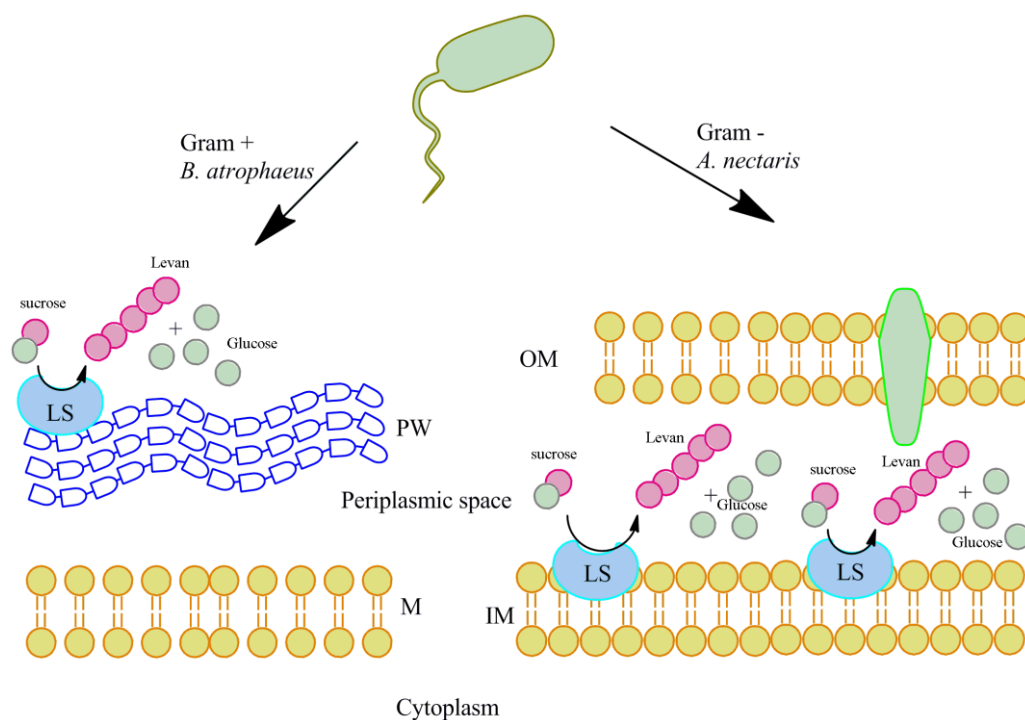
Por otra parte, no se observa un efecto claro en cuanto a la relación de polifructosa producida y sacarosa inicial en el caso de *B. atrophaeus*; obteniendo en todos los casos, concentraciones de polifructosas entre 3 y 4 g/L tras 36 horas de cultivo.

Estas diferencias de resultados se podrían explicar por la diferente composición de la pared bacteriana entre ellas.

En el caso de la bacteria Gram negativa (*A. nectaris*), la enzima levan-sacarasa se encuentra situada en el espacio periplásmico, anclada en la membrana interna; mientras que en las bacterias Gram positivas (*B. atrophaeus*), se encuentra anclada a la pared de péptidoglicano, de tal forma, que se encuentra expuesta al medio de cultivo directamente. Esta última disposición supone que, dado que nos encontramos en un reactor perfectamente mezclado, la enzima y la sacarosa o glucosa no se encuentran en contacto durante mucho tiempo, pues se traslada rápidamente al medio de cultivo; y no se crea una concentración local elevada de estos productos. Sí que se crea esta concentración local en el caso de *A. nectaris*, dado que el proceso de difusión al exterior (atravesar la membrana externa) es más lento, y aquí no existe la mezcla perfecta (en el espacio periplásmico). Esta elevada concentración local del inhibidor explicaría por qué se produce inhibición en el caso de las bacterias Gram negativas. Esta inhibición

también había sido descrita previamente para otra bacteria Gram negativa como *Z. mobilis* (Senthilkumar y Gunasekaran, 2005), mientras que para bacterias Gram positivas como *B. subtilis*, no se han reportado inhibiciones por sustrato (Ing-Lung et al, 2005). Esta explicación puede comprenderse de manera más ilustrativa observando la Figura 4.5.

Los resultados relacionados con la producción del polímero pueden explicarse de la misma forma que los presentados para el caso de la proliferación de la biomasa, dado que la presencia de sustrato en el espacio periplásmico no inhibe solamente el crecimiento de la biomasa, sino también la producción de polifruktosa que va acoplada.



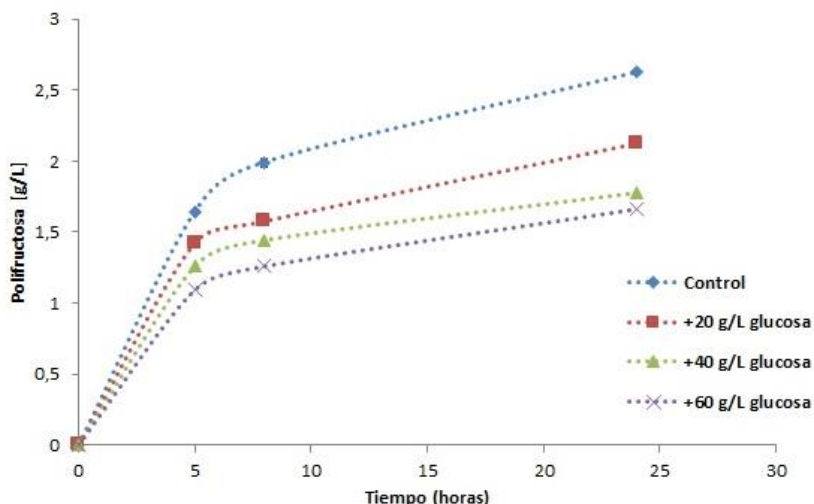
**Figura 4.5.** Esquema de la producción de polifruktosa desde las dos especies empleadas. M: membrana, LS: levan-sacarasa, PW: pared de péptidoglicano, IM: membrana interna, OM: membrana externa.

Finalmente, si comparamos los rendimientos obtenidos con estas dos especies, que no se habían estudiado previamente para este fin, se observan rendimientos semejantes a los ya descritos. Como ejemplo se pueden citar los trabajos de Ing-Lung et al. (2011), que obtiene, 3.6 g/L de polímero en 21 horas con *B. subtilis* (natto) ATCC 7058; o los presentados por Jathore et al. (2012), que obtienen entre 1 y 2 g/L de polímero cuando se cultiva *Pseudomonas fluorescens* durante 30 horas.

#### **2.4. Estudio de la inhibición de la producción de polifruktosa**

Como se ha mencionado anteriormente, se observa una inhibición por sustrato presente en *A. nectaris*. Para comprobar el origen de dicha inhibición, si pertenece a la sacarosa inicial, o sin embargo, si es fruto de la glucosa hidrolizada y presente en el medio como sub-producto, se realizaron experimentos de adición extra de glucosa. Esta hipótesis se basa en la evidencia ya descrita en el caso de *S. cerevisiae*, donde la glucosa es un inhibidor de la enzima invertasa, encargada de catalizar la hidrólisis de sacarosa (Elorza et al., 1977).

Se añadieron diferentes concentraciones de glucosa (20, 40 y 60 g/L) al medio base de *A. nectaris*, y se siguió el crecimiento y producción de polímero con los métodos ya descritos previamente. Los resultados se muestran en la Figura 4.6.



**Figura 4.6. Efecto de la inhibición por glucosa añadida en el cultivo de *A. nectaris***

Como se desprende de la figura 4.4, se observa una reducción en la producción del polímero a medida que se incrementa la concentración de glucosa (pasando de 2.0 g/L para el caso control a 1.2 g/L cuando se añaden 60 g/L de glucosa extra al medio de cultivo).

Por tanto, es posible concluir que la producción de polímero va asociada al crecimiento microbiano, observándose un fenómeno de inhibición en el caso de las bacterias Gram negativas. Este fenómeno puede deberse a la glucosa generada tras la hidrólisis que queda en el espacio periplásmico, reduciendo la eficiencia enzimática, y retardando la producción del polímero levan.

### 3. ESTUDIO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN MICROBIANA

#### 3.1. Formulación del modelo

Las cinéticas del crecimiento microbiano se pueden calcular utilizando un modelo no-estructurado, donde la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) se determina utilizando la ecuación diferencial descrita en la ecuación 4.5.

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D) \cdot x \quad (\text{Ec. 4.5.})$$

Dado que nuestro sistema está trabajando en discontinuo, la tasa de dilución ( $D$ ) se considera cero. Además, los resultados de la biomasa se pueden ajustar al modelo tradicional de crecimiento microbiano, conocido como modelo de Monod. La tasa de obtención del producto ( $R_p$ ) (polifruktosas en nuestro caso), se puede calcular siguiendo la ecuación 4.6.

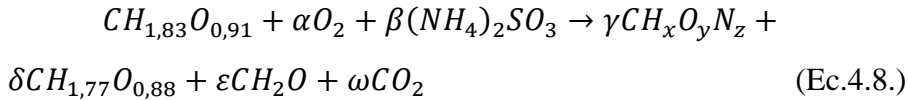
$$R_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (\text{Ec. 4.6.})$$

Partiendo de esta ecuación, se trata de responder a la cuestión de si la producción de polímero va acoplada a la multiplicación de la biomasa (modelo de Leudeking-Piret, 1959), utilizando para ello, la ecuación 4.7.

$$R_p = \beta_{xp} \cdot \mu + m_p \quad (\text{Ec. 4.7.})$$

Donde el coeficiente  $\beta_{xp}$  relaciona la formación de biomasa y la formación de producto, y  $m_p$  es conocido como coeficiente de mantenimiento, y envuelve el balance energético de la producción (gasto de ATP).

Por otro lado, se busco determinar los coeficientes estequiométricos para calcular las necesidades y consumos de los diferentes sustratos, utilizando para ello, la ecuación 4.8.



Que se corresponde con:

Sacarosa + oxígeno + sulfato de amonio → biomasa + polifruktosa + (glucosa y fructosa) + dióxido de carbono

Para la elaboración de este balance de materia, se asume que el extracto de levadura aportado (de composición no determinada) es necesario como fuente de aminoácidos esenciales, y no presenta una contribución significativa en el balance de materia.

Finalmente, asumiendo que la enzima sigue una cinética de Michaelis-Menten, como otros autores han señalado previamente (Strube et al., 2011), se podrán determinar los parámetros más importantes de dicha cinética,  $V_{max}$  y  $K_M$ , que aparecen descritos en la ecuación 4.9.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S} \quad (Ec. 4.9.)$$

### 3.2. Ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto

Tras la determinación de la biomasa producida, así como de la concentración de polifruktosa en el medio de cultivo, se procedió a

ajustar los datos experimentales, tomando en consideración los diferentes experimentos realizados con distintas concentraciones iniciales de sacarosa. Debido a las variaciones de rendimiento en el caso de la bacteria Gram negativa *A. nectaris*, se propone para ésta una cinética de inhibición por sustrato (sacarosa), como se detalla en la ecuación 4.10.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (\text{Ec. 4.10.})$$

Por ajuste de los datos experimentales, se determinaron los parámetros de la ecuación anterior, resultando:  $\mu_{max}$ : 3.207 h<sup>-1</sup>,  $K_s$ : 2068 g/L,  $K_i$ : 9.73 g/L.

En el caso de la bacteria Gram positiva *B. atrophaeus*, los datos experimentales sugerían el ajuste a una ecuación clásica, como el modelo de Monod, sin que exista inhibición, que se detalla en la ecuación 4.11.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Ec. 4.11.})$$

Para este caso, el ajuste de los datos experimentales resultó en los siguientes parámetros determinados:  $\mu_{max}$ : 0.107 h<sup>-1</sup>,  $K_s$ : 5.48 g/L.

En ambos casos, se obtuvieron buenos coeficientes de correlación, y los resultados de los coeficientes muestran cómo existe una mayor tasa de crecimiento específica en el caso de la bacteria Gram positiva que en la bacteria Gram negativa.



Por otra parte, asumiendo que la enzima levan-sacarasa sigue una cinética de Michaelis- Menten como se ha descrito en la ecuación 4.9 se pudieron determinar los parámetros  $V_{max}$  y  $K_M$  para ambos tipos de bacteria. En el caso de *A. nectaris*, los valores obtenidos fueron  $V_{max}$ : 0.061 g/(L·h) y  $K_M$ : 66 g/L. En el caso de *B. atrophaeus*, los valores resultantes del ajuste fueron  $V_{max}$ : 0.109 g/(L·h) y  $K_M$ : 54 g/L. Como se puede observar, estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de una inhibición por sustrato presente en las bacterias Gram negativas, dado que *B. atrophaeus* es capaz de producir polifruktosa a doble velocidad (las velocidades máximas son el doble aproximadamente, sin cambios en las constantes de Michaelis) comparado con *A. nectaris*.

Una vez determinadas las constantes enzimáticas, se puede analizar si la producción de polifruktosa va acoplada a la multiplicación de la biomasa, siguiendo el modelo de Luedeking-Piret. Esta conclusión resulta de gran importancia para un posible escalado de la producción a volúmenes superiores.

En ambos casos, se observa una buena correlación de la producción de biomasa con la producción de nuestra molécula de interés (polifruktosa), resultando un buen ajuste de la ecuación de Luedeking-Piret, y, por tanto, la conclusión que ambas variables van acopladas.

En la Tabla 4.1 se muestran los coeficientes de la ecuación determinados para ambas especies. En ambos casos, los

valores calculados para cada concentración son muy próximos entre sí, lo que permite calcular un valor promedio. En ambos casos, el coeficiente de mantenimiento (gasto energético) puede ser considerado despreciable (muy cercano a cero). Finalmente, para poder completar la ecuación 4.8, se determinaron los coeficientes estequiométricos, mediante balances de materia a los diferentes elementos. Para realizar esos balances de materia, es necesario determinar dos parámetros de forma experimental: por un lado,  $\beta_{xp}$  es definido como el cociente entre  $\delta$  y  $\gamma$ , donde  $\beta_{xp}$  corresponde al valor obtenido de la tabla 4.1, y por otra parte,  $\delta$  puede ser calculado siguiendo la ecuación de Vigants (ecuación 4.4), tomando el valor 0.562 (Cmol Polifrutosa/Cmol sacarosa). Estos últimos resultados se muestran en la Tabla 4.2 donde vienen expresados como cociente (Cmol de compuesto / Cmol de sacarosa).

**Tabla 4.1. Determinación de coeficientes de la ecuación de Luedeking-Piret.**

<i>A. nectaris</i>			<i>B. atrophaeus</i>		
[Sacarosa] (g/L)	$B_{xp}$	$m_p$	[Sacarosa] (g/L)	$B_{xp}$	$m_p$
120	6.079	$-5 \cdot 10^{-17}$	120	1.3427	-0.0004
150	6.078	$2 \cdot 10^{-16}$	150	1.3915	-0.0071
180	6.079	$1 \cdot 10^{-16}$	180	1.3032	-0.0069
210	6.080	$-6 \cdot 10^{-17}$	210	1.4255	-0.0052
240	6.079	$2 \cdot 10^{-16}$	240	1.4133	-0.0059
270	6.079	$-8 \cdot 10^{-17}$	270	1.2588	-0.0007
Valor medio	6.079	$5.2 \cdot 10^{-17}$	Valor medio	1.3558	-0.0044

**Tabla 4.2: Coeficientes estequiométricos determinados desde los datos experimentales**

	<i>A. nectaris</i>	<i>B. atrophaeus</i>
$\alpha$	0.02	$\approx 0$
B	0.0105	0.047
$\gamma$	0.105	0.470
$\delta$	0.562	0.562
$\varepsilon$	0.301	0.180
$\omega$	0.033	$\approx 0$

Utilizando los datos recogidos en la tabla 4.2 se puede calcular el coeficiente de respiración, que se define como el cociente entre  $\alpha$  y  $\omega$ . Los resultados indican un valor de 1.69 para el caso de *A. nectaris*, mientras que es 0 en el caso de *B. atrophaeus*. Esto sugiere, que no es necesaria la utilización de oxígeno en el caso de la bacteria Gram positiva para la producción de polifruktosa, y, por tanto, no hay liberación de CO<sub>2</sub> al medio. Esto explicará la existencia de ciertas bacterias anaerobias que producen este polímero, tal y como Adamberg et al. (2015) han reportado previamente.

## 4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS POLIFRUCTOSAS PRODUCIDAS

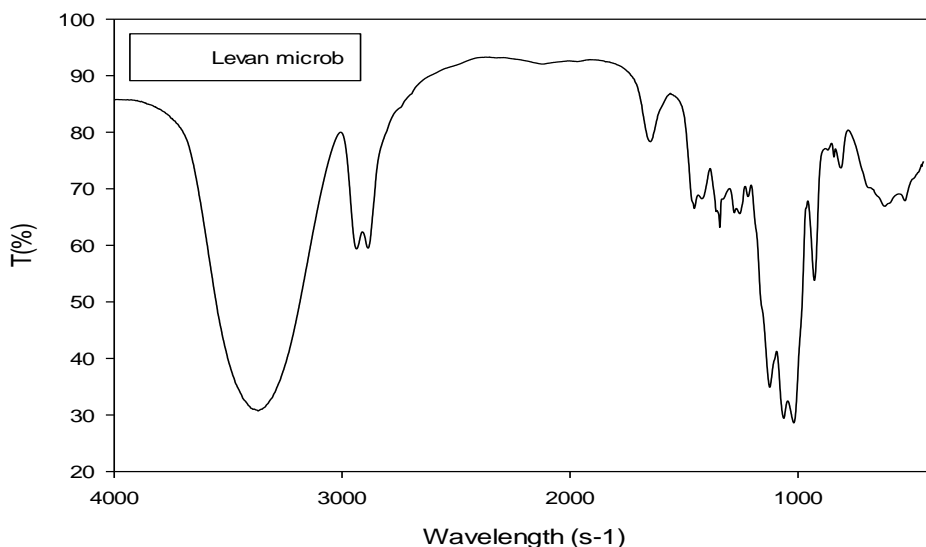
### 4.1. Caracterización química: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier, Análisis Termogravimétrico y Resonancia Magnética Nuclear

Con el objetivo de certificar que la molécula producida se corresponde con una polifruetosa, se realizaron diferentes caracterizaciones químicas, donde se pudo comprobar la naturaleza de la sustancia producida y aislada. Concretamente, esta caracterización química engloba la Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier, el Análisis Termogravimétrico, y la Resonancia Magnética Nuclear.

La determinación de los diferentes enlaces presentes en la molécula de polifruetosa se realizó a través de **Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)**, utilizando pellets de bromuro de potasio, que son analizados en un espectrómetro Perkin-Elmer (One Instrument); donde se recogieron 32 espectros de cada muestra, con una resolución nominal de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos de FT-IR muestran cómo el polímero producido se corresponde con una polifruetosa. En la Figura 4.7 se muestra el espectro obtenido para el polímero producido por *A. nectaris*. El espectro muestra la existencia de bandas en  $1170\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo C-O-C) y en  $1030\text{ cm}^{-1}$  (hidroxilo C-OH), que son los picos característicos obtenidos para los polisacáridos (Marchessault, 1962).

Además, los compuestos derivados de fructosa, suelen presentar un pico amplio en el  $2900\text{ cm}^{-1}$  y otro máximo en  $1080\text{ cm}^{-1}$  (Grube et al., 2002); ambos presentes también en los espectros representados anteriormente.

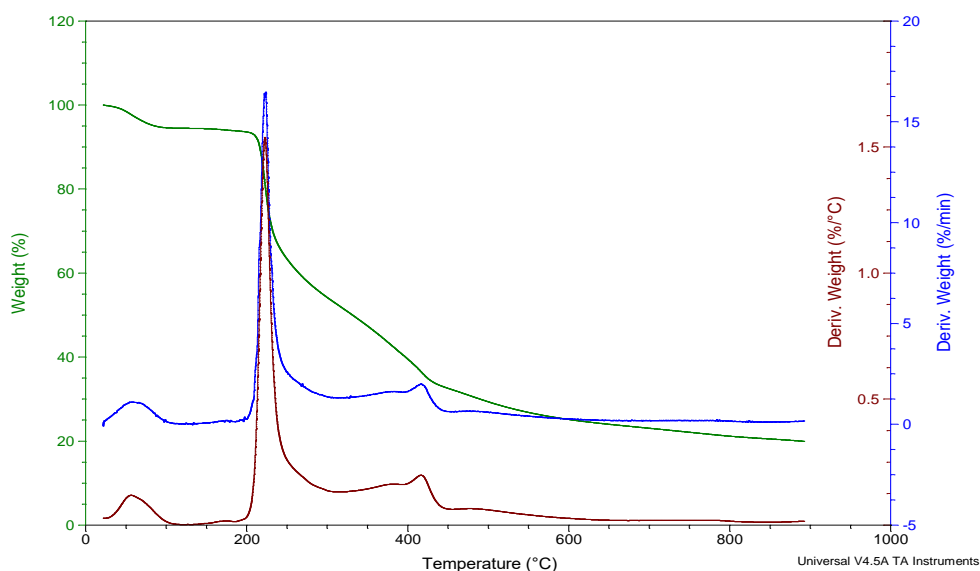


**Figura 4.7. Espectro de infrarrojo de la polifruktosa obtenida de forma microbiana con *A. nectaris*.**

Para realizar el **Análisis Termogravimétrico (TGA)** se empleó el equipo TA Instruments SDT Q600, realizando simultáneamente DTA-TGA bajo una atmósfera de nitrógeno (20 mL/min), partiendo de  $20^{\circ}\text{C}$  hasta  $900^{\circ}\text{C}$ , a razón de  $10^{\circ}\text{C}$  por minuto.

Los resultados obtenidos por TGA, representados en la Figura 4.8 muestran una pérdida de peso inicial importante a  $100^{\circ}\text{C}$ , que se explica como la eliminación de la humedad residual. La descomposición fundamental del polímero ocurre cuando se alcanzan

los 200°C (posiblemente explicada por la pérdida de los grupos hidroxilo); hasta una descomposición final, con un pico menos intenso, que se alcanza en el entorno de los 400°C, correspondiente con la combustión final del polímero. Dan et al. (2009) presentaron una curva de TGA semejante para polifruktosas, indicando, por tanto, la existencia de polifruktosas en el polímero obtenido.

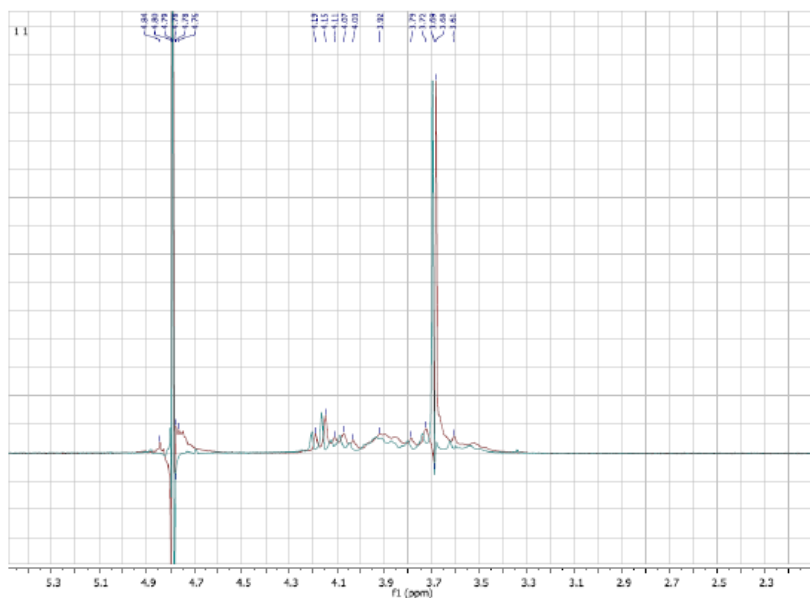


**Figura 4.8.** Evolución de la pérdida de masa por descomposición térmica analizada por TGA, de la polifruktosa producida por *A. nectaris*.

Para certificar la naturaleza del polímero utilizado, se realizó finalmente una **Resonancia Magnética Nuclear** de protón ( $^1\text{H}$ ), utilizando el equipo Varian Mercury 200 MHz, operando en 200 y 400 MHz.

El espectro de protón obtenido para las polifruktosas sintetizadas es semejante con otros espectros publicados previamente para estas moléculas (Jathore et al., 2012), y se representa en la Figura

4.9. El espectro presenta un pico de gran intensidad a 5 ppm, seguidos de picos con intensidades menores a 4 y 3.5 ppm.



**Figura 4.9.** Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (H-RMN) de la polifruktosa producida por *A. nectaris*.

Todas estas caracterizaciones químicas llevan a concluir que la naturaleza del polímero producido por las bacterias es una polifruktosa.

## 4.2. Composición porcentual del polímero

Como se ha mencionado en la introducción, en el mecanismo de síntesis de polifruktosa, está involucrada la utilización de una molécula de glucosa en el inicio de la polimerización, que actúa como cebador de la reacción. Por esta razón, resulta de interés conocer la proporción de glucosa y fructosa en el polímero sintetizado, para de esta forma estimar el número de fructosas polimerizadas de media en cada cadena.

Para conseguir esto, se realizó la hidrólisis del polímero de forma ácida, hasta sus constituyentes moleculares (monosacáridos).

Para ello, se preparó una disolución de polímero en concentración 1 mg/mL en agua desionizada a pH 3.1 (corregido con HCl 1 M), que se incubó a 55°C durante 6 días para inducir la hidrólisis ácida de la polifrutosa (De Bekers et al., 2005). Tras esto, los azúcares se cuantificaron mediante HPLC-MS (equipo Waters ZQ-4000 con detección por índice de refracción Waters 410). Las condiciones de cromatografía se establecieron en caudal 0.6 mL/min, fase móvil de agua con ácido sulfúrico a 0.005 M, en una columna Rezex Roa Organic Acid H+ de dimensiones 300 x 7.8 mm.

Las concentraciones obtenidas fueron las siguientes: **46 ppm glucosa, 881 ppm fructosa y 0 ppm sacarosa**. La suma de monómeros, por tanto, se establece en 927 ppm, lo cual representa más del 90% de rendimiento en la hidrólisis (considerando una concentración inicial de polímero de 1 mg/mL). Estos valores indican una proporción de 19-20 moléculas de fructosa por cada molécula de glucosa.

### 4.3. Determinación del peso molecular

El peso molecular del polímero se determinó de dos formas diferentes: la forma tradicional, por cromatografía de exclusión de tamaño en una columna de permeación de gel (SEC-GPC), y por



técnica de ionización, conocida como MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight).

En el caso de SEC-GPC, los experimentos se realizaron utilizando dos columnas diferentes (Ultrahydrogel 500 y Ultrahydrogel 250, ambas comercializadas por Waters). Se empleó polietilenglicol como patrón de calibración. El polímero fue dispersado en la fase móvil, a concentraciones entre 1 y 2 mg/mL, que está compuesta por sulfato de sodio 0.1 M en agua. Esta fase móvil, junto con la inyección de muestra se bombea a la columna con un caudal de 0,8 mL/min; al final de la cual se encuentra el detector de refracción a 40°C. Basándose en el tiempo que tarda en alcanzar el detector, se estima el peso molecular de la sustancia. En este caso, dado que se analiza la disolución, el sistema reconoce las estructuras superiores generadas por auto-ensamblado de las diferentes cadenas de polifruktosa. Esto será comprobado posteriormente, en la sección quinta de este capítulo.

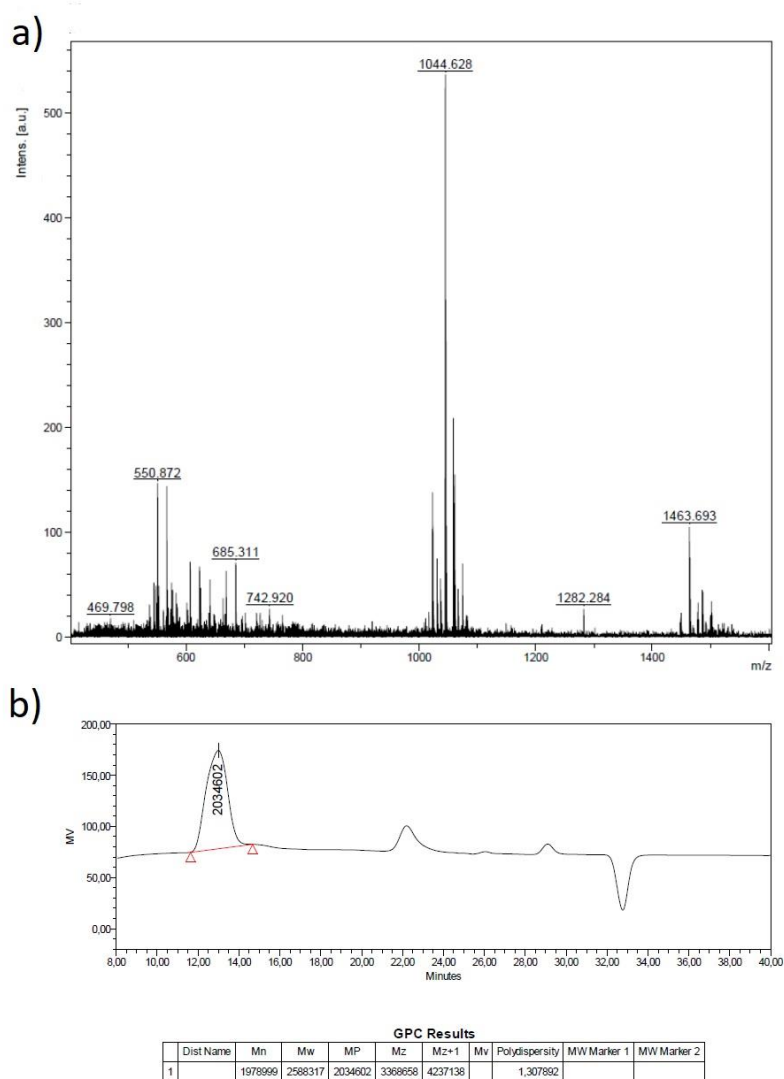
En el caso de MALDI-TOF, los experimentos se realizaron con el espectrómetro de masas Ultraflex TOF-TOF (Bruker). Como componente de matriz se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico, y la muestra se resuspendió en agua. El proceso de ionización comprende 200 pulsos con los siguientes parámetros: 100 V por ganancia de electrones, una frecuencia de 50 Hz y un pulso de láser al 90%. El uso de esta técnica permite analizar la cadena de polímero embebida en la matriz, y, por tanto, de forma independiente, sin sufrir procesos de auto-ensamblado.

La diferente metodología empleada arroja diferencias en los pesos moleculares estimados. La diferencia radica en las condiciones de medida de una y otra técnica. Mientras que las medidas por MALDI-TOF están considerando la cadena de polifruktosa de forma aislada, las medidas realizadas por GPC, al estar en disolución, detectan el peso molecular de la partícula completa. Esta última técnica ha sido la que más se ha utilizado en trabajos previos para estimar el peso molecular de estos polímeros, y sus resultados son semejantes a los aquí presentados utilizando GPC. Sin embargo, de cara a poder certificar el peso real de una cadena aislada, la técnica de la cromatografía de exclusión molecular no puede ser usada, dado que realmente está determinando el peso molecular del agregado, que es muy superior.

La figura 4.10 representa los resultados arrojados por ambas técnicas. En la parte superior de la misma se muestra el espectro de MALDI-TOF, donde se observa que el pico principal se corresponde con 1044 Da, que equivaldría a unas 7 unidades de fructosa en cada cadena. Sin embargo, en la parte inferior, se puede observar cómo la predicción realizada desde el tiempo de elución arroja, con bastante precisión, un valor de 2600 kDa.

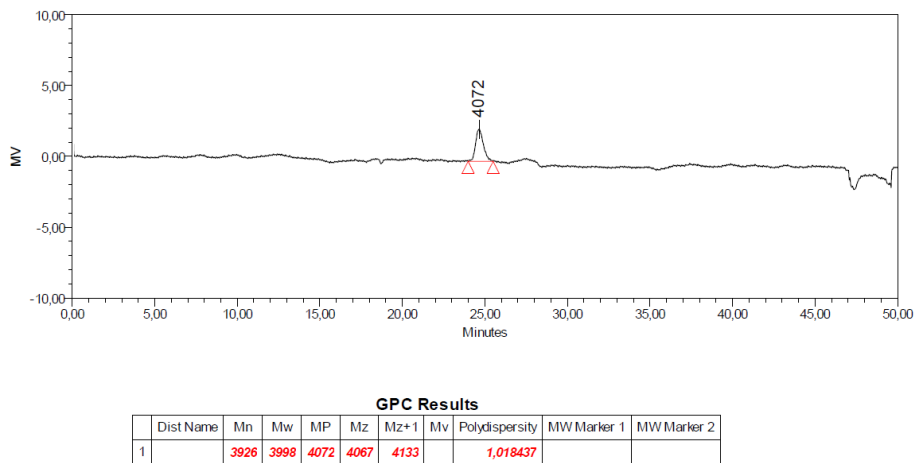
Este valor está en concordancia con otros pesos moleculares descritos previamente en la bibliografía (Ni et al., 2018; Shih et al., 2010; Yu et al., 2016), pero, como ya se ha comentado, se corresponde con el agregado, pues se trabaja a valores superiores a la CAC (ver sección 5.5.).

Los resultados de MALDI-TOF, fueron confirmados por ESI-MS (Electrospray ionization – mass spectrometry), donde se comprobó que los valores de pesos moleculares predichos, son independientes de la ionización empleada, y en cualquier caso, se sitúan en el entorno de 1 kDa al tratar cadenas aisladas.



**Figura 4.10. Peso molecular calculado de la polifruktosa de *A. nectaris*, por dos técnicas diferentes. a) MALDI-TOF, b) SEC-GPC.**

Para poder comprobar la hipótesis que se acaba de plantear, es decir, que mediante GPC se mide el peso molecular de toda la partícula, se ejecutó un experimento utilizando la misma columna en la que el polímero fue dispersado a concentración inferior a la conocida como concentración de agregación crítica (explicada detalladamente en el siguiente capítulo). Al tratarse de una reorganización, si el polímero se sitúa debajo de esa concentración, no es capaz de organizarse en partículas, y el detector solamente será capaz de estimar el peso molecular de una cadena aislada. El cromatograma obtenido con el polímero a 0.1 mg/mL (valor crítico de agregación, como se verá más adelante) se muestra en la Figura 4.11.



**Figura 4.11. Cromatograma GPC obtenido para el polímero levan cuando se trabaja a valores inferiores a la concentración crítica.**

En la figura 4.11 se puede observar cómo, cuando no tenemos agregación, el único pico presente se encuentra a 24-26 minutos. Sin embargo, cuando trabajamos con el sistema agregado (figura 4.10b), se observa un pequeño pico a ese tiempo, que es despreciable en

comparación con el pico principal obtenido a 12 minutos. Por tanto, esto indica, que el peso molecular de las cadenas aisladas es el situado en 25 minutos, que, de acuerdo con los patrones, es de unos 3.9 kDa, con un valor de polidispersión (cociente entre  $M_w$  y  $M_n$ ) de 1.01. La presencia de unas pocas cadenas sin reorganizar explica la presencia también de este pico cromatográfico en el primer cromatograma.

Teniendo en cuenta la predicción de sobreestimación formulada por Wong et al. (2012), donde GPC sobreestima todos los pesos moleculares inferiores a 23 kDa, se puede concluir que el peso molecular de las cadenas aisladas es de **1-2 kDa**, y los pesos moleculares reportados mayoritariamente hasta el momento se corresponden con el peso de la partícula completa, por organización de sus cadenas simples.

## 5. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y DEL PROCESO DE AUTO-ENSAMBLADO

En esta sección se mostrarán los resultados de la caracterización de las nanopartículas de polifruktosa obtenidas a partir de ambas bacterias, gracias a la reorganización de las cadenas del polímero, buscando la conformación más estable dado su carácter anfifílico. Es decir, con la reorganización se busca enmascarar hacia el interior los segmentos hidrofóbicos de las cadenas, y exponer hacia el disolvente (agua), los segmentos más hidrofílicos.

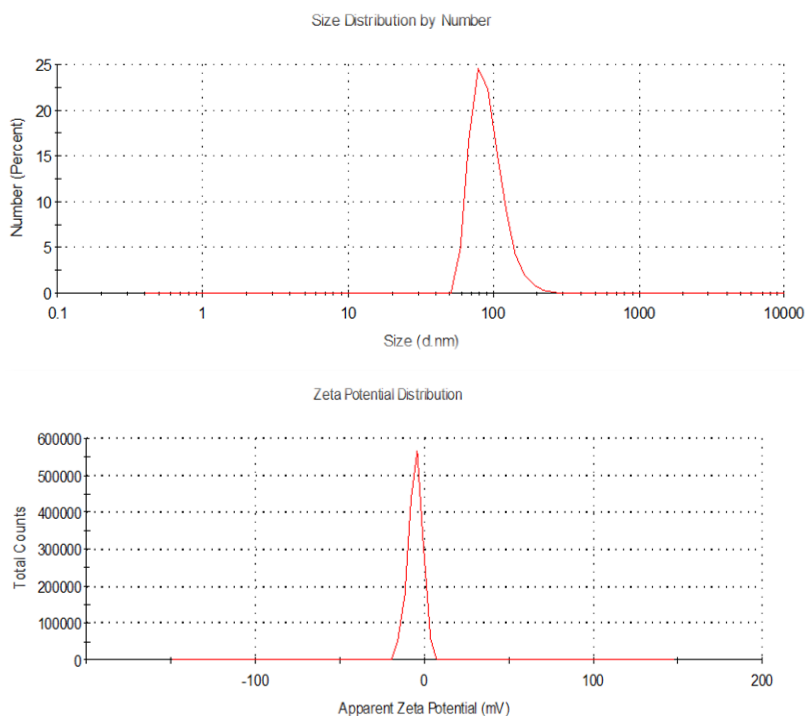
Primeramente, se presentarán los resultados obtenidos por DLS (*Dynamic Light Scattering*) relativos al tamaño de partícula, potencial zeta y estabilidad durante 15 días. Seguidamente, con las mejores partículas obtenidas (*A.nectaris*), se mostrarán los resultados de su visualización por microscopía electrónica y se estudiará la porosidad de las mismas con la isoterma BET. Posteriormente, se estudiará la adsorción inespecífica de proteínas (usando BSA como modelo), y el proceso de auto-ensamblado (determinación de la Concentración de Agregación Crítica).

Finalmente, se estudiará la estabilidad de las mismas, analizada como un balance de interacciones entre las cadenas y de éstas con el solvente (agua). Esto será determinado con el cálculo, mediante SLS (*Static Light Scattering*) del segundo coeficiente del virial.

### 5.1. Caracterización por DLS (distribución de tamaño, potencial zeta, y estabilidad)

El tamaño de partícula y la carga superficial de las partículas (potencial zeta) fueron estudiadas por DLS, utilizando el equipo *Zetasizer nano* (Malvern Instruments). El estudio de su aglomeración con el tiempo, se llevó a cabo al medir cada 24 horas el tamaño de partícula.

En la figura 4.12 se representan la distribución de tamaño de partícula (grafica superior) y su potencial zeta (gráfico inferior) para las nanopartículas producidas por auto-ensamblado de las polifruktosas obtenidas de *A. nectaris*.



**Figura 4.12. Caracterización por DLS de las nanopartículas de polifruktosa bacteriana de *A. nectaris*. a) Distribución de tamaño de partícula en número, b) distribución de zeta potencial.**

El valor de *Z-average* obtenido es inferior a 200 nm, y analizando el tamaño en número, el promedio de tamaño es  $90 \text{ nm} \pm 35 \text{ nm}$ ; por lo que sería susceptible de ser internalizada por endocitosis en las células (tamaño límite 200 nm), y ese tamaño también garantiza un elevado tiempo de circulación en sangre. El valor del índice de polidispersión se sitúa por debajo de 0.2, lo que prueba la monodispersión de las partículas, tan necesaria para una buena aplicación sistémica.

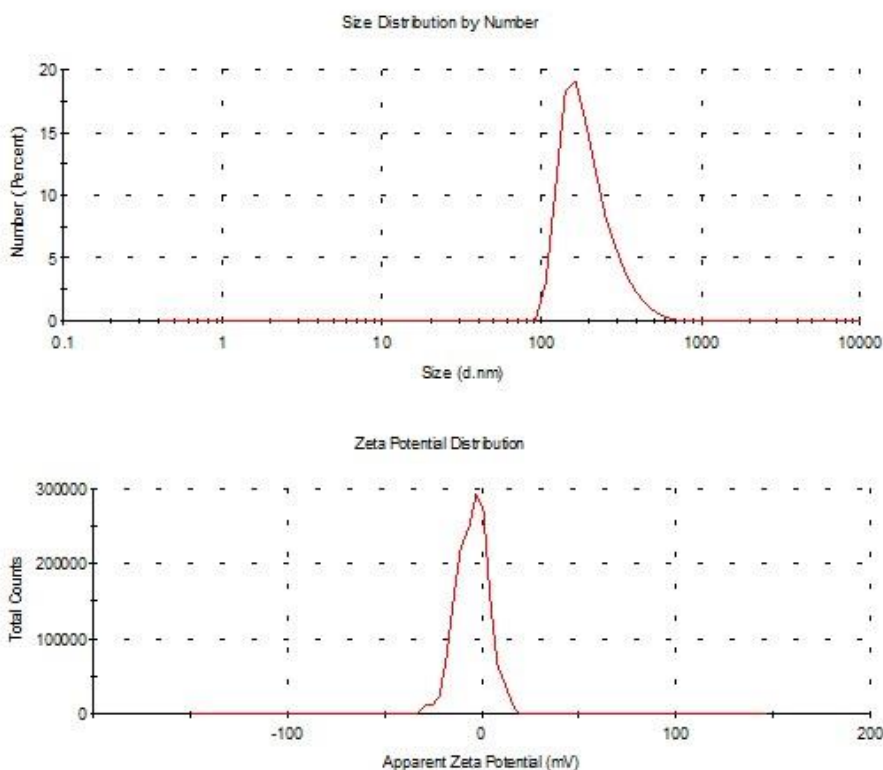
El valor de potencial zeta obtenido se sitúa en  $-4 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ ; lo cual representa un valor bajo de acuerdo con los criterios de estabilidad de partícula, donde se requieren valores absolutos de potencial zeta de al menos 15 mV para garantizar la repulsión de las mismas. Estos resultados se repitieron para las diferentes concentraciones de sacarosa ensayadas, sin modificaciones significativas entre ellos.

De igual modo, en la figura 4.13 se representa la distribución de tamaño de partícula (figura superior) y su potencial zeta (figura inferior) para las nanopartículas producidas por auto-ensamblado de las polifruktosas de *B. atrophaeus*.

Como puede observarse, también se obtienen nanopartículas con una adecuada monodispersión, aunque el valor en este caso es ligeramente superior al obtenido anteriormente (0.24 frente a 0.12), que concuerda con una mayor amplitud del pico. En la distribución de tamaño de las nanopartículas de *B. atrophaeus* se observa un desplazamiento hacia la derecha, indicando tamaños medios superiores



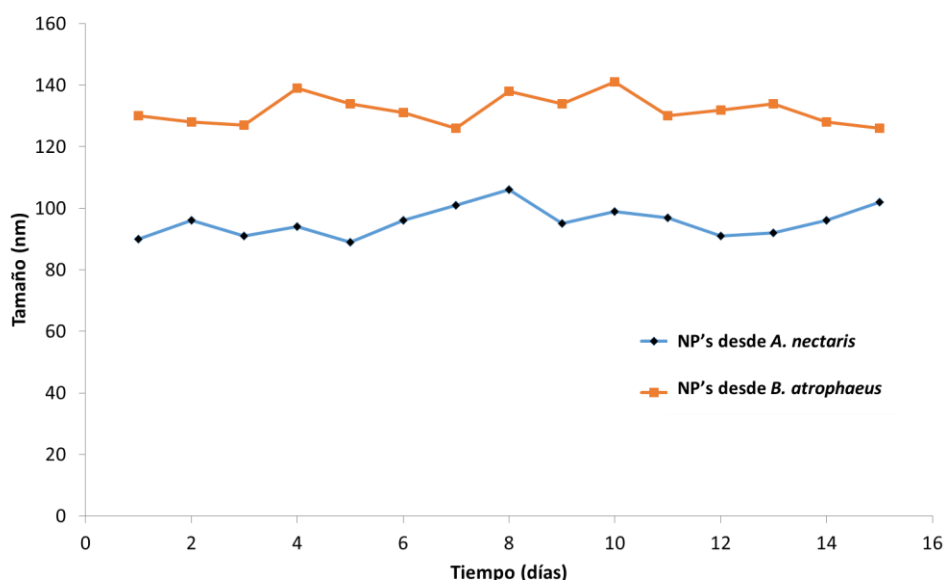
(alrededor de 150 nm), que podrían llegar a superar los 200 nm. Por esta razón, estas partículas podrían tener mayores inconvenientes para una posible aplicación sistémica de las mismas. En lo relacionado con la carga superficial (potencial zeta) no se aprecian diferencias significativas, y en el caso de *B. atrophaeus* toma el valor de  $-4.7 \pm 3.3$  mV.



**Figura 4.13. Caracterización por DLS de las nanopartículas de polifruktosa bacteriana de *B. atrophaeus*. a) Distribución de tamaño de partícula en número, b) distribución de zeta potencial.**

Debido al reducido valor de potencial zeta en ambos casos, se estudió el tamaño de partícula durante los quince primeros días tras la generación de las nanopartículas, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.14 para ambos tipos de bacterias; concluyéndose que no existe

incremento de tamaño con el tiempo, y, por tanto, las partículas son estables en tamaño a pesar de contar con una reducida carga superficial. Este resultado será completado con los obtenidos de la determinación del segundo coeficiente del virial (ver sección 5.6 de este capítulo).



**Figura 4.14.** Estabilidad de las partículas obtenidas por ambos tipos de bacterias durante los primeros 15 días tras la síntesis.

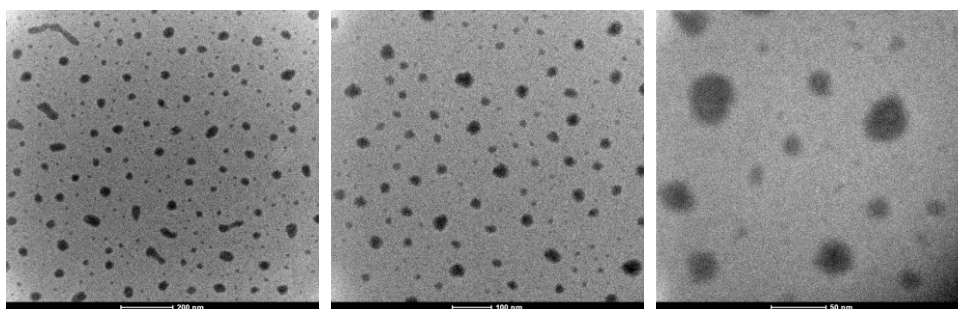
## 5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la sección anterior, se observó cómo las nanopartículas reorganizadas desde la polifruetosa de *A. nectaris* presentaban un tamaño inferior a 200 nm, que las hacía idóneas para la administración de terapias, debido a que podrían ser internalizadas celularmente por endocitosis. Sin embargo, las partículas de *B. atrophaeus* tenían un tamaño mayor, y por tanto, no podrían ser usadas con este fin. Por esta razón, en las siguientes secciones, el resto de caracterizaciones serán

realizadas exclusivamente en las partículas constituidas con polifruktosa de *A. nectaris*.

La microscopía electrónica de las nanopartículas fue realizada utilizando un microscopio T20-FEI Tecnai thermionic, operando en voltaje de 200 kV. Para la preparación de la muestra, 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de polímero 1,2 mg/mL fue depositada en una rejilla de cobre carbono (de engranaje 200), teñido de forma negativa con ácido fosfotúngstico, y secado durante 4 horas a temperatura ambiente (*Soporte técnico y de personal de la Universidad de Zaragoza*).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica se muestran en la figura 4.15, donde se observan partículas esféricas y monodispersas, con un tamaño más pequeño al calculado anteriormente por DLS (explicable por el encogimiento producido debido a la deshidratación sufrida durante el proceso de preparación de las muestras).



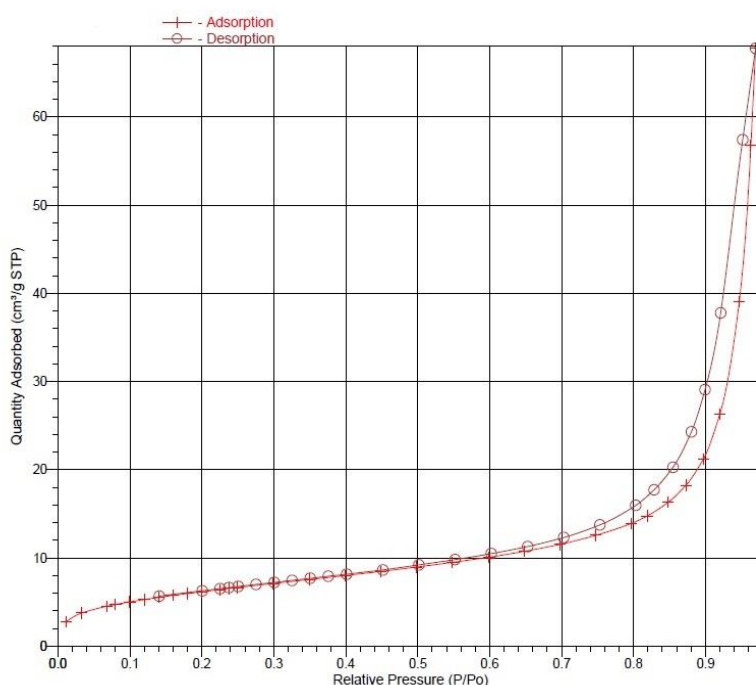
**Figura 4.15.** Imágenes de las nanopartículas obtenidas por TEM.

### 5.3. Determinación de porosidad por BET

Resulta interesante determinar la porosidad de un polímero debido a que sus propiedades como transportador de fármacos pueden verse condicionadas por este parámetro entre otros. Por ese motivo, el área superficial que deja el polímero reorganizado fue estudiado con el equipo de adsorción de gases Tristar 3000 (Micromeritics Instrument Corporation). El gas de muestra fue previamente desgasificado durante 3 horas a 40°C en condiciones de vacío. La isoterma se evaluó a 77K usando N<sub>2</sub> como adsorbato en un rango de presiones relativas ( $P_s/P_0$ ) desde 0.01 a 0.97.

El área específica de la superficie se determinó mediante el ajuste de los datos de adsorción a la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Para el cálculo del volumen de poro se estudió la desorción del nitrógeno, siguiendo el método de Barrett-Joyner-Halenda (*Soporte técnico y de personal de la Universidad de Zaragoza*).

El análisis de la isoterma BET, y su tratamiento de datos indican que las nanopartículas de polifruktosa presentan un área superficial de 23 m<sup>2</sup>/g, con una isoterma característica de los materiales no porosos, donde la adsorción no es restrictiva en monocapa-multicapa hasta que se alcanzan elevadas presiones relativas. En la figura 4.16 se representa la isoterma BET obtenida de las partículas de polifruktosa de *A. nectaris*.



**Figura 4.16. Isotherma de adsorción BET, para determinación de la porosidad de las nanopartículas de polifruktosas obtenidas de forma microbiana.**

#### 5.4. Adsorción no-específica de proteínas

La adsorción inespecífica de proteínas es una de las más importantes limitaciones para el uso de nanosistemas en aplicación sistémica, debido a que la adsorción de proteínas del plasma, formando la corona, es el primer paso para que se desarrolle la respuesta inmune, y por tanto, estos componentes son reconocidos como extraños por el sistema, y fagocitados por los macrófagos.

El estudio de la adsorción inespecífica de proteínas en las nanopartículas se llevó a cabo utilizando BSA (albúmina de suero

bovino), comercializada por Sigma-Aldrich, como proteína modelo; dado que es la más abundante en el torrente sanguíneo. Para este estudio se usó como base el protocolo descrito previamente por Yoshikawa et al. (2012). El polímero seco se dispersó en agua a diferentes concentraciones (en el rango de 1 a 3 mg/mL), y a las 24 horas, se añadió BSA a las diferentes muestras, hasta conseguir una concentración final de BSA en la muestra de 1 mg/mL. La mezcla se conservó en incubador a 37°C durante la noche, para promover la adsorción y tras esto, se precipitó con etanol (96%), en proporción de 3 volúmenes de etanol por cada volumen de la mezcla; con el objetivo de separar la proteína no adsorbida de las nanopartículas (que contienen la BSA adsorbida). La proteína no adsorbida se sitúa en el sobrenadante, mientras que la adsorbida precipita junto al polímero. La proteína en el sobrenadante fue medida utilizando Biodrop como equipo, a longitud de onda 280 nm (espectrofotometría de alta precisión). El porcentaje de proteína adsorbida se calcula con la diferencia entre la concentración inicial y la presente en el sobrenadante.

El porcentaje de proteína adsorbida en las nanopartículas de polifruktosa desde *A. nectaris* se sitúa en el 12%, lo cual representa un valor bajo si se compara con otros estudios reportados para otro tipo de nanopartículas; pero aún debe ser mejorado. Para ello, se podrían utilizar ciertas alternativas como la PEGilación, que se han visto efectivas en la reducción de esta adsorción inespecífica hasta valores de 8% (Yildirim et al., 2013).

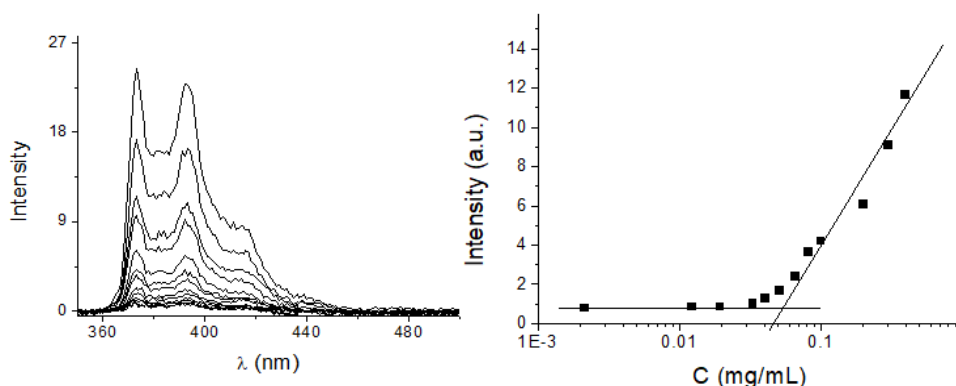
### **5.5. Determinación de la Concentración de Agregación Crítica (CAC)**

Los resultados relativos al peso molecular demostraron que las nanopartículas están constituidas por la asociación de numerosas cadenas sencillas de polifruktosas, que se reorganizan para formar nanopartículas, cuando se alcanza una determinada concentración, que es conocida como Concentración de Agregación Crítica (CAC).

Para determinar la CAC de las polifruktosas en agua, se utilizó pireno a baja concentración (condición de saturación  $\approx 10^{-7}$  M); debido a que el pireno genera importantes cambios en la fluorescencia de un sistema cuando se mueve de un entorno apolar a un entorno polar. Además, la estructura de la banda de vibración en el espectro indica la polaridad del medio (Wilhem et al., 1991). El cociente de intensidad de fluorescencia desde el tercer pico (386 nm) al primer pico (375 nm), denotado como I3/I1, depende del entorno en el que se encuentren las moléculas de pireno. Este cociente I3/I1 disminuye cuando la polaridad del medio aumenta. Estos valores se encuentran en el rango de 1.87 a 0.6 en el caso de solventes de hidrocarburos alifáticos (Wang y Winnick, 1990). Tanto la intensidad de fluorescencia como el cociente I3/I1 fueron empleados para determinar el valor de CAC.

En la figura 4.17 se representan los espectros de intensidad de fluorescencia (lado izquierdo) y la evolución de la intensidad de fluorescencia a 373 nm con las diferentes concentraciones de polímero (en escala logarítmica, lado derecho). En el valor de la CAC, se produce un cambio importante en la intensidad de fluorescencia debido

al incremento de la cantidad de pireno que se encuentra presente en los nuevos entornos hidrofóbicos, que ahora dejan las partículas al reorganizarse. Tras el ajuste lineal de los datos experimentales, se establece el punto de corte en 0.05 mg/mL. Por encima de este punto, se obtiene un valor de 0.95 en el cociente I3/I1, indicando que se está incrementando la localización del pireno en el entorno hidrofóbico.



**Figura 4.17. Espectro de fluorescencia de pireno para determinar la concentración crítica de agregación de nanopartículas desde vía bacteriana.**

Este valor es semejante al que obtuvieron Dan et al. (2009) para una molécula semejante como la inulina, que presenta un valor de CAC de 0.07 mg/mL. Siguiendo las recomendaciones de Adams et al. (2003), las micelas poliméricas (como es este caso), deberían tener una CAC alrededor de  $10^{-6}$  M para evitar el proceso de desagregación que suele existir cuando son administradas de forma sistémica. Realizando la conversión, tomando en consideración los pesos moleculares calculados anteriormente, nuestro sistema presenta una CAC de  $3 \cdot 10^{-5}$  M, que se encuentra muy cerca del valor deseado. Sin embargo, aún debe ser mejorado, indicando la necesidad de buscar alternativas que pudiesen seguir reduciendo la CAC.



## 5.6. Determinación del Segundo Coeficiente del Virial

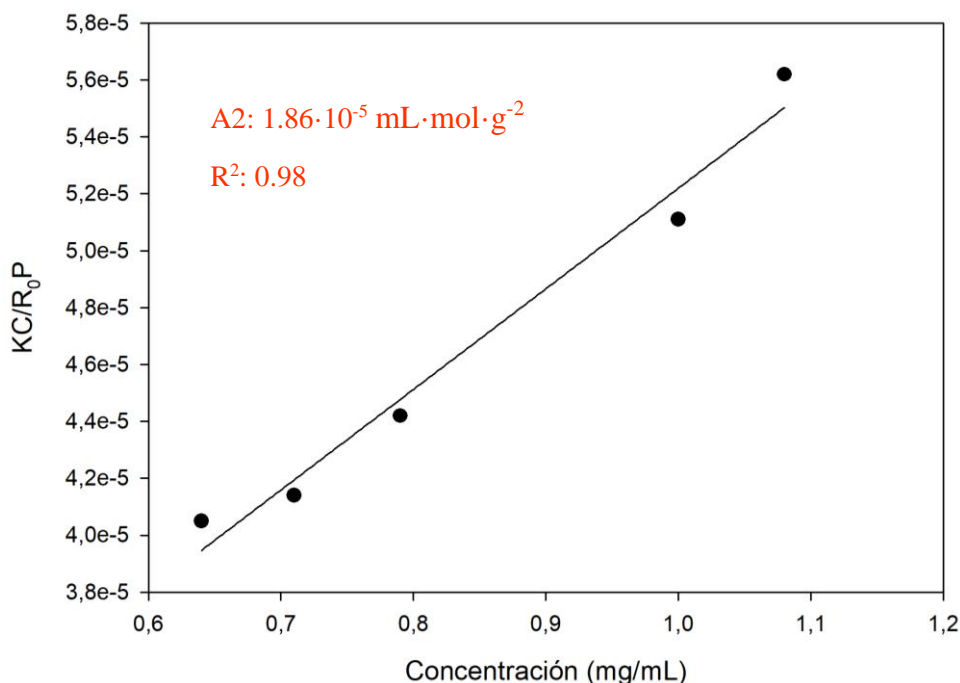
El segundo coeficiente del virial ( $A_2$ ) es un parámetro termodinámico que describe la estabilidad de los coloides como un balance entre las fuerzas de atracción y repulsión entre las cadenas de polímero y el disolvente. Si el 2º coeficiente del virial toma valores negativos significa que las interacciones partícula-partícula son más fuertes que las interacciones partícula-solvente; mientras que, si toma un valor positivo, predominan las interacciones partícula-solvente (Alford et al., 2008; Quigley y Williams, 2015). Por tanto, sería deseable que nuestro sistema tomase valores positivos, para evitar la agregación partícula-partícula, y asegurar una buena biodistribución en el torrente sanguíneo.

Este parámetro se puede determinar por SLS (*Static Light Scattering*, por sus siglas en inglés), siguiendo la ecuación de Raleigh, que se muestra en la ecuación 4.12. Mediante la preparación de diferentes concentraciones de partícula en agua ( $C$ ), midiendo la señal que ofrece de luz refractada ( $R_\theta$ ), se determina  $A_2$  como pendiente del ajuste de los datos experimentales a una línea recta.

$$\frac{K \cdot C}{R_\theta} = \left( \frac{1}{MW} + 2 \cdot A_2 \cdot C \right) \cdot P(\theta) \quad (\text{Ec. 4.12.})$$

Para las medidas se utilizó tolueno como referente de señal (*scattering standard*), y se utilizaron 7 concentraciones en el rango donde las cadenas se encuentran reorganizadas (de 0.6 a 1.2 mg/mL).

En la figura 4.16 se representan los valores del cociente  $KC/R_{90}$  frente a la concentración para las nanopartículas de polifruktosa de *A. nectaris*. Se representa a su vez, la línea de tendencia que se utilizó para estimar la pendiente, que se corresponde con  $A_2$ , que para este sistema toma el valor de  $1.86 \cdot 10^{-5} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ .



**Figura 4.18. Representación del gráfico de Debye para la polifruktosa obtenida de forma microbiana desde *A. nectaris*.**

Este valor positivo indica la presencia de fuerzas repulsivas entre las partículas, dado que las interacciones partícula-solvente son más fuertes, garantizando la estabilidad del coloide. El valor obtenido para el segundo coeficiente del virial en este sistema es semejante a otros descritos previamente para sistemas coloidales (en el orden de magnitud:  $10^{-5} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ ) (Uramoto et al., 2016).

## **6. UTILIZACIÓN DE OTROS MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIFRUCTOSA**

### **6.1. Aprovechamiento de los residuos de la industria alimentaria**

Son muchos los trabajos recogidos en la bibliografía donde se han estudiado el efecto de pH, temperatura, tipos de substrato en el crecimiento de estos microorganismos para producir polifruktosa con altos rendimientos. Sin embargo, no se han encontrado trabajos que busquen reducir el coste del proceso, empleando residuos de otras industrias. Con este fin, se estudió la posibilidad de sustituir el extracto de levadura (precio elevado) por un sub-producto de la industria alimentaria; concretamente, la pulpa originada en el proceso de exprimido de naranjas. Esta pulpa se calentó a 90°C en agua desionizada, con el objetivo de extraer los nutrientes de ella, y tras esto, se sometió a un proceso de filtrado para retirar los sólidos restantes en suspensión. A esta mezcla, se le añadió una fuente de nitrógeno inorgánica (nitrato de amonio a 1 g/L) y sacarosa (a concentración 120 g/L) para garantizar la abundancia suficiente de nutrientes en el crecimiento.

Como la composición de la extracción realizada desde la pulpa no era conocida, se realizó un análisis microelemental, para conocer su composición en términos de átomos de oxígeno, hidrógeno, carbono, azufre y nitrógeno. Para realizar esto, se empleó una modificación del método de Pregl y Dumas (combustión flash dinámica). Este método es capaz de estimar la proporción relativa de carbono, hidrógeno,

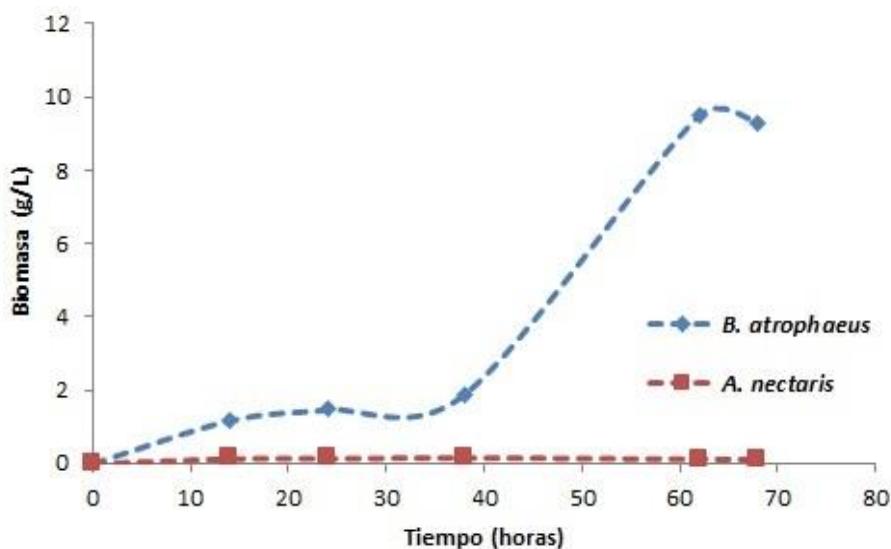
nitrógeno y azufre; deduciendo el oxígeno por diferencia. Las muestras se incluyen en un vial de plata y se inyecta oxígeno al vial.

Tras esto, el vial se coloca en un horno a alta temperatura para provocar la combustión. Los productos de dicha combustión son CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>. Estos gases se transportan por una tubería utilizando Helio como gas portador, y terminan en una tubería de oxidación-reducción. Al final, el flujo de gases pasa por un detector de infrarrojo, que es capaz de estimar la concentración de estos gases, y, por tanto, del carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre.

El resultado de este análisis para la extracción de la pulpa resultó en la siguiente fórmula molecular: CH<sub>1.76</sub>O<sub>0.90</sub>N<sub>0.04</sub>. Debido a esa baja proporción de nitrógeno, se añadió una fuente externa de nitrógeno inorgánico como el nitrato de amonio, que se ha descrito como adecuada para el crecimiento bacteriano (Gomaa, 2014).

Además, se añadió sacarosa dado que es imprescindible para que se produzca la hidrólisis y posterior polimerización que da lugar a la polifruktosa.

En la figura 4.19 se representan las curvas de crecimiento para ambas especies.



**Figura 4.19.** Efecto de la incorporación de residuos de naranja como fuente de nitrógeno en el crecimiento de *A. nectaris* y de *B. atrophaeus*.

Como se observa en la figura 4.19, *A. nectaris* no es capaz de crecer bajo estas condiciones, mientras que *B. atrophaeus* es capaz de crecer casi a la misma velocidad que lo hace en el medio rico (a las 40 horas se encuentra en el entorno de 2 g/L). Posteriormente, tras este tiempo de lento crecimiento, aparece su fase exponencial, posiblemente explicada por el proceso de adaptación de la bacteria a un medio mucho menos rico. Una vez retirado el cultivo, y purificado el polímero, se calcula que la presencia de polifruktosa en el caldo sería de 24.2 g/L; un valor muy semejante a los obtenidos cuando se tiene el medio enriquecido en todos sus componentes.

## 6.2. Valoración económica del uso de estos residuos

Los resultados previamente presentados sugieren la posibilidad de usar residuos de la industria alimentaria para producir polifruktosa

desde *B. atrophaeus*. Como se comentó antes, esta polifruetosa no podría ser empleada para la creación de nanosistemas de administración sistémica por su tamaño, pero si puede ser empleada en otras muchas aplicaciones de estas moléculas. Por esta razón, se presenta a continuación una pequeña estimación económica de la reducción en el coste de producción mediante el uso de esta alternativa.

La Tabla 4.3 representa el coste de cada una de las materias primas para ambos medios.

**Tabla 4.3. Estimación de costes para la producción de polifruetosa desde *B. atrophaeus*. Comparativa entre el medio enriquecido y el medio que emplea residuos de la industria alimentaria.**

Componente	Precio por masa (€/g)	Concentración en el medio (g/L)	Precio por volumen (€/L)
<b>Medio enriquecido (4.999 €/L)</b>			
Extracto de levadura	0.061	7.0	0.427
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0004	2.5	0.001
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.0988	1.6	0.158
MgCl <sub>2</sub>	0.0457	0.4	0.018
Sacarosa	0.0293	150	4.395
<b>Medio de los residuos de la industria (4.482 €/L)</b>			
Residuos pulpa	0	-	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.0868	1.0	0.0868
Sacarosa	0.0293	150	4.395

Como se observa en la Tabla 4.3, la reducción es de 0.517€ por cada litro del medio de cultivo, lo que se corresponde con aproximadamente un 10% de reducción en el coste del medio. Teniendo en cuenta, que se producen unos 24 gramos de polifruktosa por cada litro de medio de cultivo, estaríamos hablando de 0.02 € de ahorro en el coste del medio para cada gramo de polifruktosa vendida.

## 7. CONCLUSIONES

A lo largo del presente capítulo se estudió la producción del biopolímero levan desde dos microorganismos diferentes (*A. nectaris* como ejemplo de bacteria Gram negativa, y *B. atrophaeus* como ejemplo de bacteria Gram positiva). Para ambos casos se estudió el crecimiento, así como la producción del polímero, determinando los parámetros cinéticos más importantes para ambos casos. Teniendo en cuenta los resultados descritos en este capítulo puede concluirse que el polímero sigue una cinética de inhibición por el intermediario glucosa, y una cinética de Leudeking-Piret donde la producción de polímero es directamente proporcional al crecimiento microbiano.

El polímero obtenido fue caracterizado por diferentes técnicas físico-químicas de cara a certificar la naturaleza del mismo (RMN, TGA, FT-IR, BET, GPC, etc), así como las nanopartículas (tamaño, carga superficial, segundo coeficiente del virial, forma y estabilidad) que éste forma en disolución, debido a su carácter anfifílico. Todas estas caracterizaciones certificaron la naturaleza del polímero producido, y se observó la obtención de nanopartículas, con una adecuada distribución de tamaño para ambos tipos de bacterias, moviéndose en el rango de 100 a 300 nm. Las nanopartículas obtenidas desde *A. nectaris* presentan mejores valores de tamaño y monodispersión. De igual forma se caracterizó el proceso de auto-ensamblado, determinando el valor de la concentración crítica a partir de la cual comienza la reorganización (alrededor de 0.05 mg/mL). También se valoró la adsorción inespecífica de proteínas a las



partículas, que resultó ser del 12% en peso; lo cual resulta un valor prometedor para una potencial aplicación sistémica de estas nanopartículas.

Finalmente, se estudió la posibilidad de utilizar otros sustratos más económicos para abaratar el coste del proceso. Concretamente, el uso de residuos del procesamiento de naranjas como fuente de nitrógeno. Esta estrategia resultó efectiva para el cultivo de *B. atrophaeus*, y tras un balance económico se estimó que esta alternativa reducía en un 10% el coste del medio de cultivo, para la misma cantidad de polímero producida.

---

**Artículos publicados relacionados con el capítulo:**

Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight. *Microbial Cell Factories* 16(2017), 91.

Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: microbial vs. cell-free systems. *International Journal of Biological Macromolecules* 137 (2019), 62-68.



# **Capítulo 5**

---

## **Producción de polifruetosa por vía enzimática**



## **1. INTRODUCCIÓN**

El aislamiento de enzimas desde organismos, para la obtención de sustancias de interés fue un punto clave en el desarrollo de la Biotecnología, pues permitió una producción más eficaz que con el uso de microorganismos en algunos casos, obteniendo ventajas frente a los cultivos tradicionales. A este hecho hay que añadir la expansión de las técnicas recombinantes que permiten incrementar el grado de expresión de determinadas proteínas, y, por tanto, conseguir procesos más eficientes y rentables (Adrio y Demain, 2010).

Sin embargo, en la producción de polímeros de origen microbiano, esta opción no ha sido estudiada tan ampliamente. El entorno de la síntesis del polímero, la presencia o no de determinados metabolitos, puede afectar a cuestiones esenciales de la naturaleza de un polímero como su longitud o sus ramificaciones; y eso puede condicionar sus propiedades. Es por esta razón, que la mayoría de los polímeros se siguen produciendo por las vías convencionales (Lu, 2017).

En lo que se refiere a las polifruktosas, algunos autores han aislado la enzima responsable (levan-sacarasa) de las bacterias (Xabier y Ramana, 2017; Szwengiel et al., 2016), y han explorado la vía libre de células, con solo la adición de sacarosa a la reacción. El uso de estos sistemas presenta importantes ventajas comparado con los tradicionales, como la desaparición de los problemas de contaminación de medios de cultivo con otras especies, o mejores y más sencillos

procesos de recuperación del producto de interés (desaparece la necesidad de eliminar la biomasa y esterilizar) (Wilding et al., 2018).

Relativo a lo descrito anteriormente, es destacable el trabajo presentado por Szwengiel et al., (2016) utilizando la enzima aislada desde *B. subtilis*, donde optimizó la síntesis analizando parámetros como el pH o la presencia de ciertos cofactores como el magnesio o el manganeso. Sin embargo, no se han identificado aún las diferencias existentes en cuanto a la formación de nanopartículas por auto-ensamblado de moléculas producidas de una y otra forma. Existe bastante bibliografía de las nanopartículas obtenidas de forma microbiana, pero aún hay mucha falta de información en las que se obtienen de forma enzimática, sin la mediación de microorganismos (Demir-Sezer et al., 2015).

Asumiendo estas consideraciones, en el presente capítulo se va a detallar la forma de producir polifruktosa de forma enzimática, y a continuación, se va a caracterizar de forma general dicha polifruktosa, como se realizó en el capítulo anterior con la obtenida de forma microbiana.

Posteriormente, se presentarán las cinéticas de producción enzimática para diferentes condiciones, de cara a controlar de forma precisa, producción y tamaño de las cadenas sintetizadas. De igual forma, se estudiará el efecto de varios factores en la producción y el peso molecular de las cadenas, dada la importancia de este parámetro en las aplicaciones biomédicas (Yoon et al., 2004). Concretamente se estudiarán:

- Parámetros directamente relacionados con la síntesis:
  - Concentración de sustrato (sacarosa)
  - Concentración de enzima
  - Temperatura
- Adición de otros azúcares y cofactores:
  - Adición de glucosa
  - Adición de lactosa
  - Adición de ion manganeso
  - Adición de ATP
- Modificación de sustrato: rafinosa

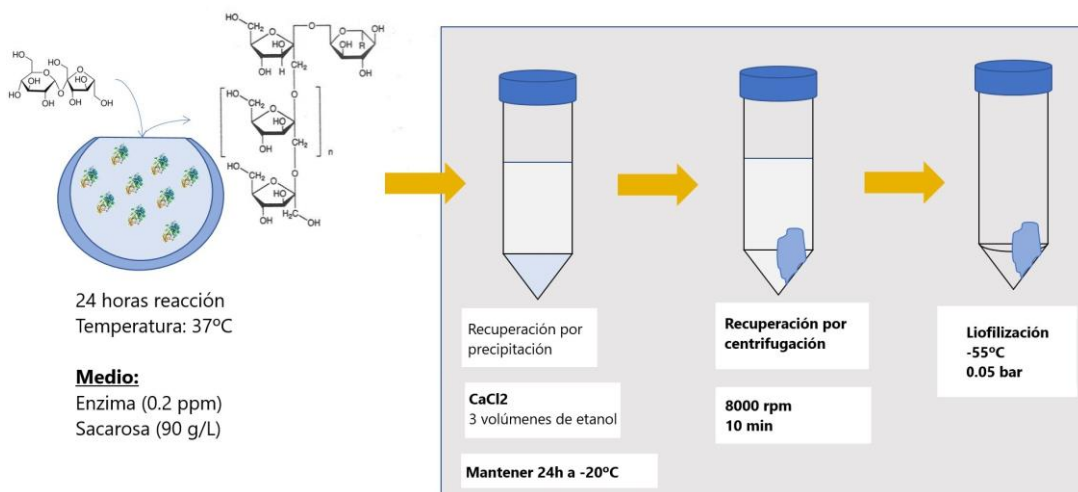
## 2. MÉTODO DE PRODUCCIÓN ENZIMÁTICO

Para la producción enzimática de polifruktosa se compró la enzima a la compañía americana Creative Enzymes. Concretamente se adquirió la enzima Fructosiltransferasa 68S de *B. subtilis* (NATE-1384). Las diferentes reacciones se llevaron a cabo en reactores de AFORA, con volumen de reacción 100 mL, y termostáticamente controlados debido a una camisa existente alrededor del reactor, conectada con un baño termostatzado. Como caso base se empleó una concentración de 90 g/L de sacarosa, y 0.2 mg/L de enzima, en agua desionizada. Estos parámetros se fueron variando posteriormente para estudiar el efecto de ellos en la producción de polifruktosas.

Tras tres días, la reacción alcanzó el máximo valor de conversión, y el polímero se puede aislar por precipitación con etanol (adición de 3 volúmenes de etanol por cada volumen de caldo de cultivo), siguiendo el método propuesto por Jathore et al., (2012). La mezcla se mantuvo a -20°C durante 24 horas, para favorecer la precipitación en un tubo de centrífuga. Pasado este tiempo, se sometió a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante. El pellet se secó por liofilización (Telstar, -55°C, 0.050 bar).

En la Figura 5.1 se muestra un esquema de los pasos realizados para la obtención y purificación del polímero.





**Figura 5.1. Esquema del proceso de síntesis y precipitación de polifruktosa vía enzimática.**

En los experimentos realizados, con las condiciones estándar arriba descritas, los rendimientos de polímero se encuentran en el rango de 18-22% de conversión (mg polímero/mg sacarosa inicial). Estos valores son ligeramente superiores a otros presentados previamente. Por ejemplo, Bersaneti et al. (2018), obtuvo un rendimiento del 12% y Santos-Moriano et al. (2015), del 15% en Fructooligosacáridos obtenidos con la enzima levan-sacarasa.

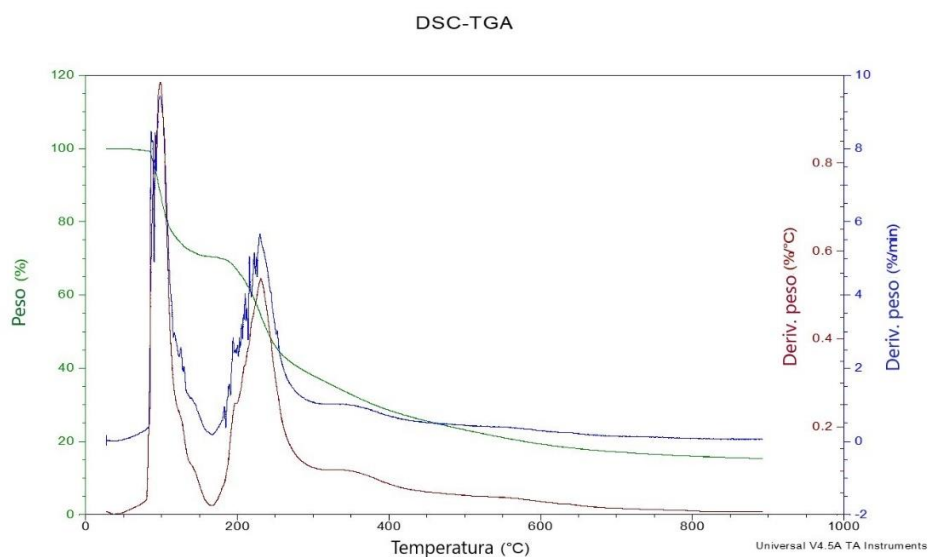
### **3. CARACTERIZACIÓN DE LAS POLIFRUCTOSAS PRODUCIDAS POR VÍA ENZIMÁTICA**

A lo largo de esta sección, se presentarán, de forma análoga a cómo se realizó durante el capítulo anterior, los resultados de las caracterizaciones realizadas en las polifruktosas obtenidas de forma enzimática. En todos los casos, los protocolos para obtener dichos resultados son los mismos que los que se detallaron en el capítulo 4.

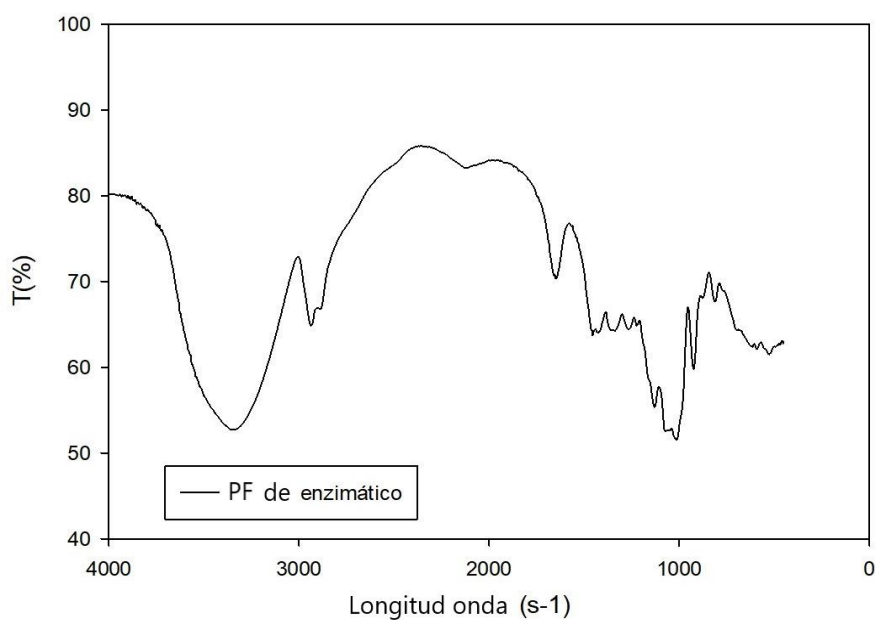
#### **3.1. Caracterización química de las polifruktosas (TGA, FT-IR, H-RMN, BET)**

A nivel químico, el polímero obtenido fue caracterizado por FT-IR, TGA, BET y H-RMN. En el caso de TGA, cuyo espectro se representa en la Figura 5.2 se observa la existencia de un pico mayor al pico que se obtenía con la polifruktosa de origen microbiano. Esta diferencia se podría explicar por la presencia de cierto etanol residual, que se utilizó para precipitar el polímero, y no ha sido completamente eliminado durante el secado por liofilización. En el caso de 200°C y 400°C se obtienen picos semejantes a los obtenidos en el capítulo anterior.

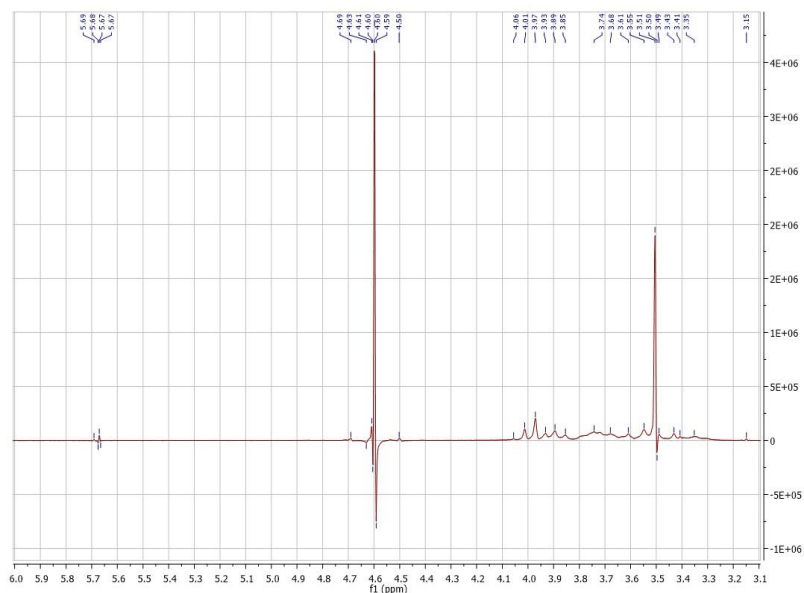
Para los espectros de FT-IR (Figura 5.3.), H-RMN (Figura 5.4.) y BET (Figura 5.5.) no se aprecian diferencias significativas con la forma tradicional de obtener polifruktosas, lo que sugiere que a nivel de composición química no existen variaciones importantes entre una y otra forma de producción.



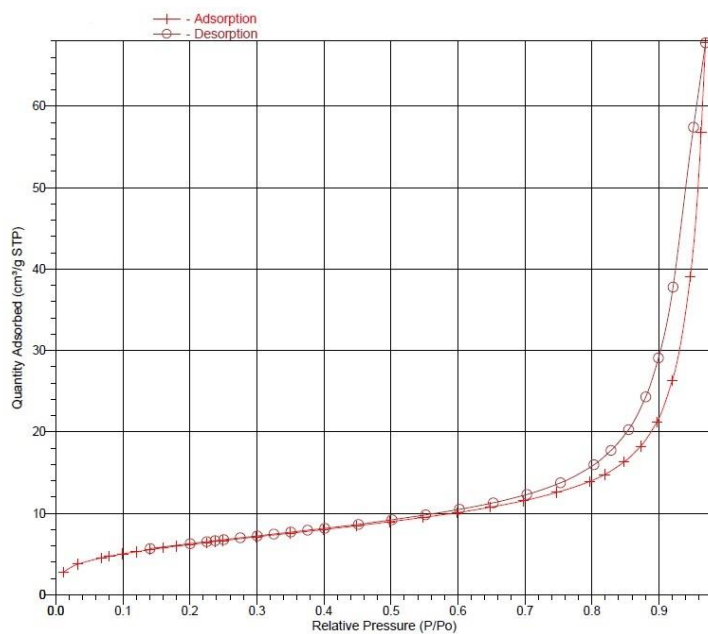
**Figura 5.2.** Espectro de TGA para polifruktosa obtenida vía enzimática.



**Figura 5.3.** Espectro de infrarrojo para polifruktosa obtenida vía enzimática.



**Figura 5.4. Espectro de resonancia magnética nuclear para polifruktosa obtenida vía enzimática.**



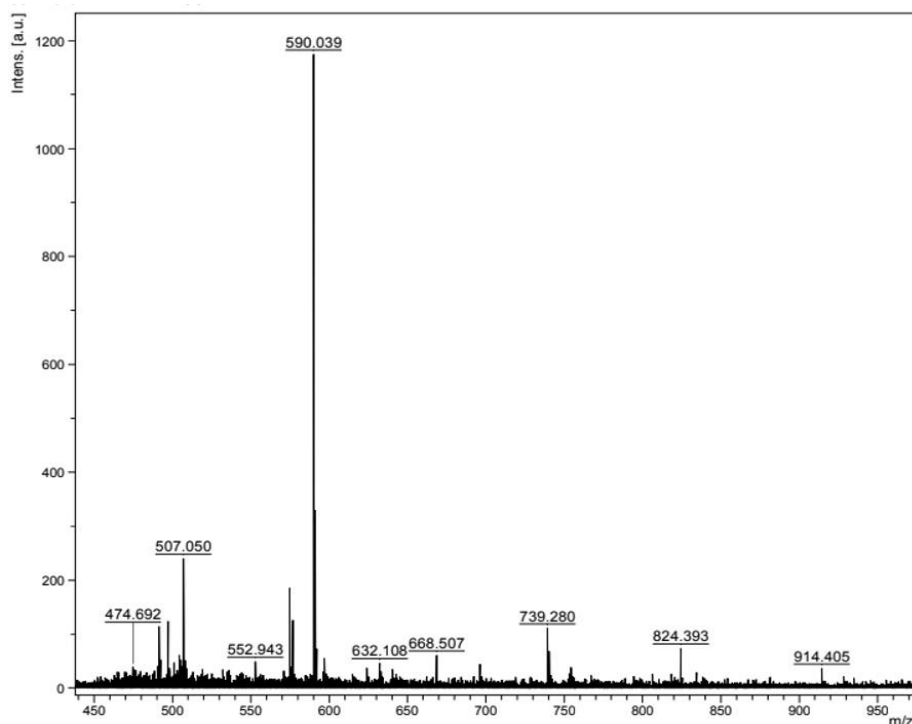
**Figura 5.5. Isotherma BET para adsorción y desorción de N<sub>2</sub> en polifruktosa producida vía enzimática.**

De igual manera, con el fin de conocer la relación entre glucosa y fructosa presente en el polímero, se llevó a cabo una hidrólisis ácida, seguida de cromatografía HPLC-MS para identificar la composición relativa en azúcares. Los resultados indicaron la presencia de **103 ppm de glucosa y 838 ppm de fructosa, con 0 ppm de sacarosa.**

Estos resultados indican que la hidrólisis se ha producido completamente (no hay restos de sacarosa, y la suma de los monómeros, 941 ppm, se aproxima a 1 mg/mL de concentración inicial de polímero), siendo el rendimiento de hidrólisis superior al 90%. Tomando en consideración estos valores, se calcula que la longitud promedio de las cadenas de polifrutosa en este caso, alcanzarían los 8 residuos de fructosa.

De igual modo, se determinó el peso molecular utilizando ambos sistemas: MALDI-TOF y SEC-GPC. Los resultados vuelven a poner de manifiesto las diferencias técnicas entre ambas, y refuerzan la hipótesis de cadenas de bajo peso molecular que se reorganizan en agregados, que presentan pesos moleculares elevados (determinados por GPC).

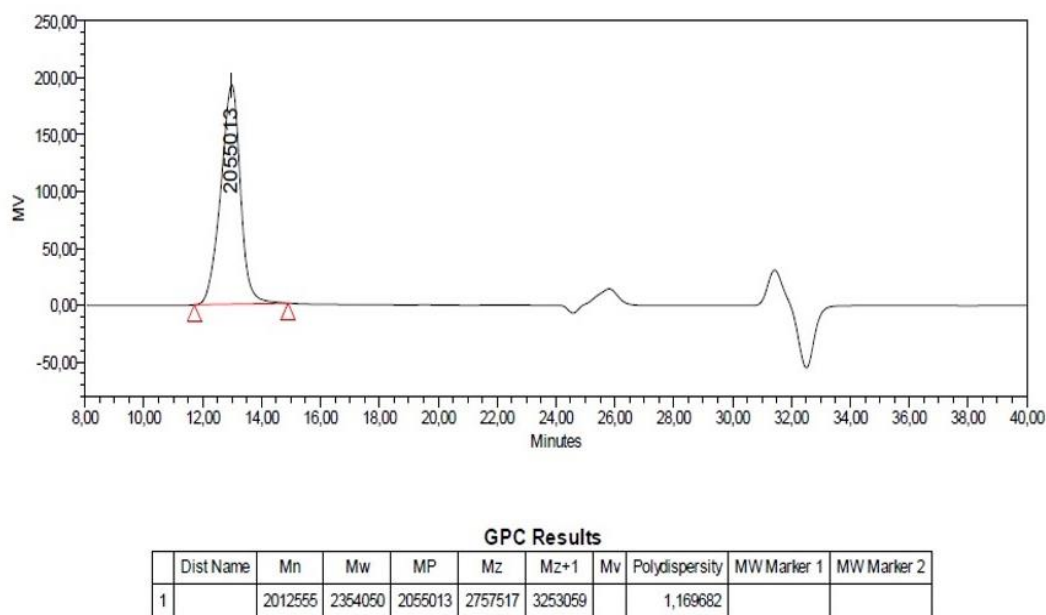
En la Figura 5.6. se representa el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF, donde destaca un pico de forma predominante sobre el resto, a 590 Da. Este resultado supone una reducción en el peso molecular comparado con las polifrutosas obtenidas de forma tradicional (1050 Da).



**Figura 5.6. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF para polifruktosa producida por vía enzimática.**

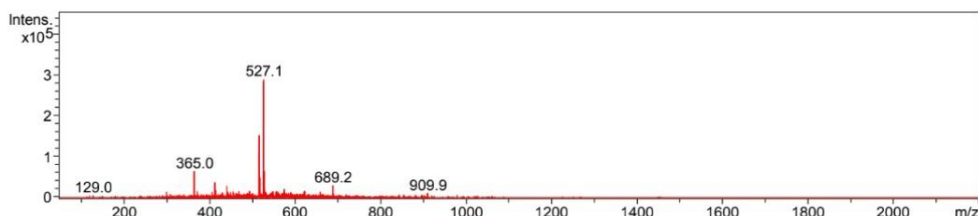
Una justificación posible de este valor inferior, está fundamentada en el entorno donde tiene lugar la polimerización. La enzima levan-sacarasa presente en la pared bacteriana se encuentra en un espacio donde existen otras sustancias además de sacarosa, tales como metabolitos, factores de crecimiento, oligoelementos o ATP; mientras que en el caso de la polimerización enzimática, solamente se encuentra sacarosa. Todas estas moléculas podrían modificar la actividad de la enzima (Mukherjee et al., 2018), y conseguir cadenas más largas. Esta hipótesis será abordada y desarrollada en profundidad en la sección 4.5 de este capítulo.

En la figura 5.7 se representa el cromatograma obtenido por SEC-GPC, donde el peso molecular supera los 2000 kDa, como ocurría con el polímero obtenido desde microorganismos ( $M_n = 2013$  kDa y  $M_w = 2354$  kDa). Este resultado vuelve a indicar, que se corresponde con el peso molecular de todo el agregado, que es muy semejante al obtenido de la forma clásica.



**Figura 5.7. Cromatograma obtenido por SEC-GPC para polifruktosa por vía enzimática, a concentración superior a la crítica.**

Al igual que se realizó en el capítulo 4, los resultados de MALDI-TOF fueron confirmados por ESI-IT, que se encuentran representados en la Figura 5.8.



**Figura 5.8. Espectro de ESI-IT para polifruktosa producida vía bacteriana.**

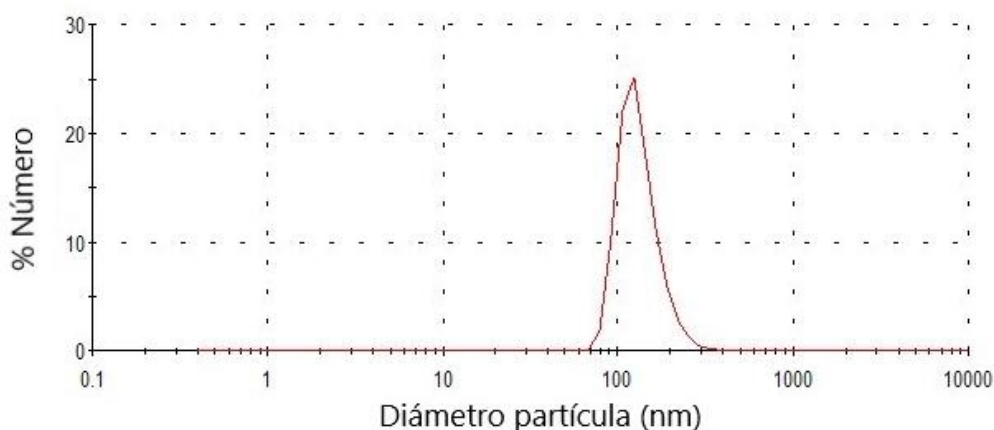
El peso molecular de las cadenas, tiene su efecto en otros parámetros importantes, tales como el segundo coeficiente del virial, el tamaño, o la concentración de agregación crítica. En las siguientes secciones se podrá comprobar cómo el peso molecular condiciona estos parámetros en las polifruktosas obtenidas de forma enzimática.

### 3.2. Caracterización de las nanopartículas obtenidas

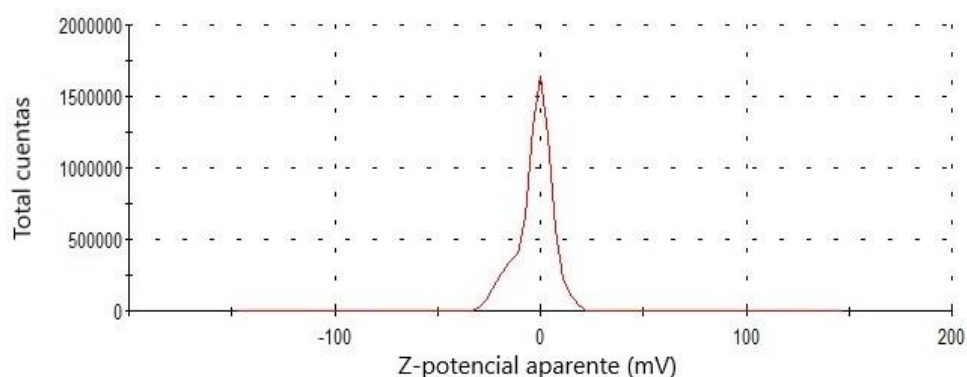
Como se explicó en el capítulo anterior, las cadenas de polifruktosa son capaces de reorganizarse en agua y constituir nanopartículas. A lo largo de esta sección, se caracterizarán dichas nanopartículas atendiendo a su tamaño, carga superficial, estabilidad, y forma, utilizando las medidas de DLS y la microscopía electrónica.

Utilizando la dispersión dinámica de luz, se puede determinar la distribución de tamaño de partícula y la carga superficial de éstas. En la figura 5.9 se representa la distribución de tamaño de estas nanopartículas, y en la figura 5.10 la distribución de la carga superficial de las mismas (Zeta potencial).





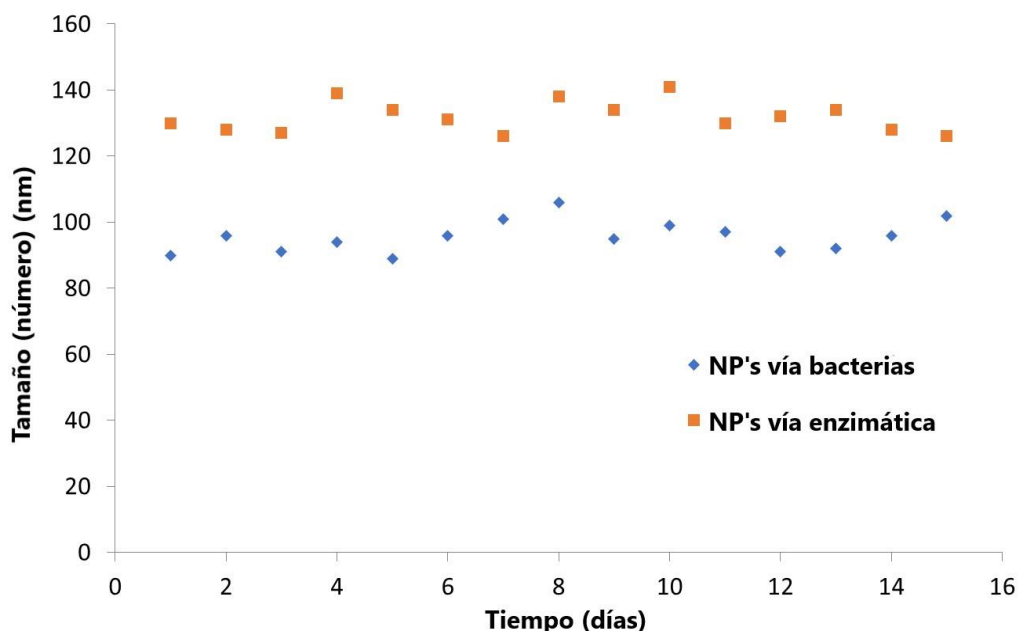
**Figura 5.9. Distribución de tamaño de partícula con polifrufructosa obtenida vía enzimática.**



**Figura 5.10. Distribución de la carga eléctrica superficial (Zeta potencial) de las nanopartículas obtenidas desde polifrufructosa de vía enzimática.**

Se puede observar que el tamaño de las nanopartículas se encuentra en torno a 110 nm con este sistema, y el valor obtenido de polidispersión (PDI) es inferior a 0.1, lo que indica una buena distribución de tamaño, siempre por debajo de la barrera de 200 nm que se considera crucial para una buena internalización celular. Atendiendo

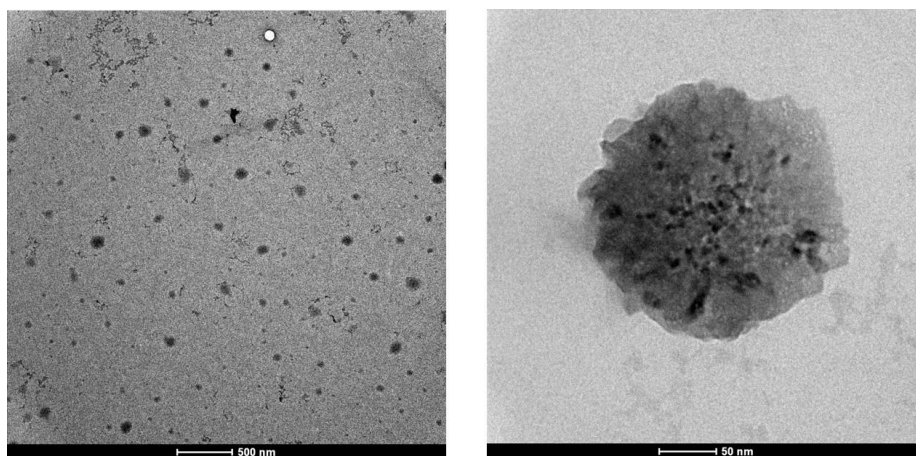
a la Figura 5.10 se observa un potencial zeta medio de  $-4 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ , que podría indicar ciertas fuerzas atractivas entre las partículas que acabarían con la agregación. Sin embargo, se realizó un experimento de estabilidad, donde se midió el tamaño de partícula durante los 15 días siguientes a la preparación de las nanopartículas; y se observó (Figura 5.11.) cómo no existen variaciones significativas en el tamaño, y por tanto, no hay agregación de las mismas. Este fenómeno también se repetía en el caso de las nanopartículas de origen bacteriano. Esto se verá corroborado con la determinación del segundo coeficiente del virial presentado en la sección 3.3.



**Figura 5.11. Evolución del tamaño de las nanopartículas con el tiempo al ser conservadas en reposo.**

Finalmente, para comprobar la esfericidad, distribución y forma de las nanopartículas, se realizaron fotografías utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Algunas imágenes tomadas se

muestran en la Figura 5.12, donde se puede observar que el tamaño es inferior al predicho por DLS, debido al proceso de deshidratación que sufren las partículas antes de este tratamiento. En cualquier caso, las imágenes corroboran una buena distribución y una buena forma.

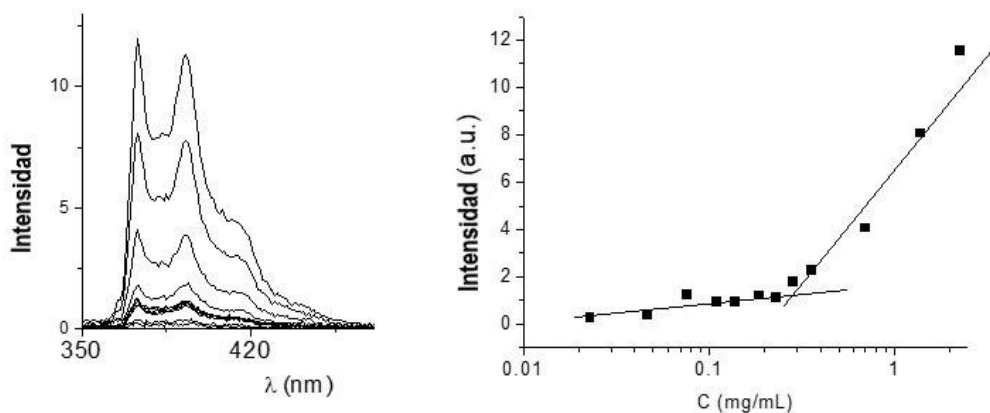


**Figura 5.12. Imágenes de microscopía electrónica de las nanopartículas obtenidas por vía enzimática.**

Dado que el sistema se plantea para una posible administración sistémica como transportador de fármacos, es necesario estudiar la adsorción inespecífica de proteínas, empleando el mismo procedimiento que en el capítulo 4. En este caso, los resultados indican una adsorción de 0.1% (mg BSA/mg nanopartículas), lo que se puede considerar como despreciable. Este valor resulta de gran interés, puesto que presenta a estas partículas como no-adsorbedoras de las proteínas del torrente sanguíneo. Esto solventaría uno de los principales problemas de muchos de los nano-tratamientos: su reconocimiento y eliminación por el sistema inmune inespecífico (Vaisocherova et al., 2008).

### 3.3. Estudio del proceso de auto-ensamblado

Como ya se ha mencionado anteriormente, las cadenas se encuentran de forma aislada hasta que se alcanza una concentración crítica, que implica la reorganización de las mismas en nanopartículas. De la misma forma que se realizó con las polifruktosas obtenidas de forma microbiana, se determinó por fluorimetría la concentración de agregación crítica (CAC) como parámetro fundamental para comprender y controlar el proceso de auto-ensamblado (paso de las cadenas sencillas a la forma de nanopartículas). En la figura 5.13a se encuentra el espectro de fluorescencia para el pireno, en el entorno de diferentes concentraciones de polímero. En la parte derecha de dicha figura (b), se observa la representación de las intensidades de fluorescencia emitidas por el pireno en función de la concentración de polímero (en escala logarítmica).

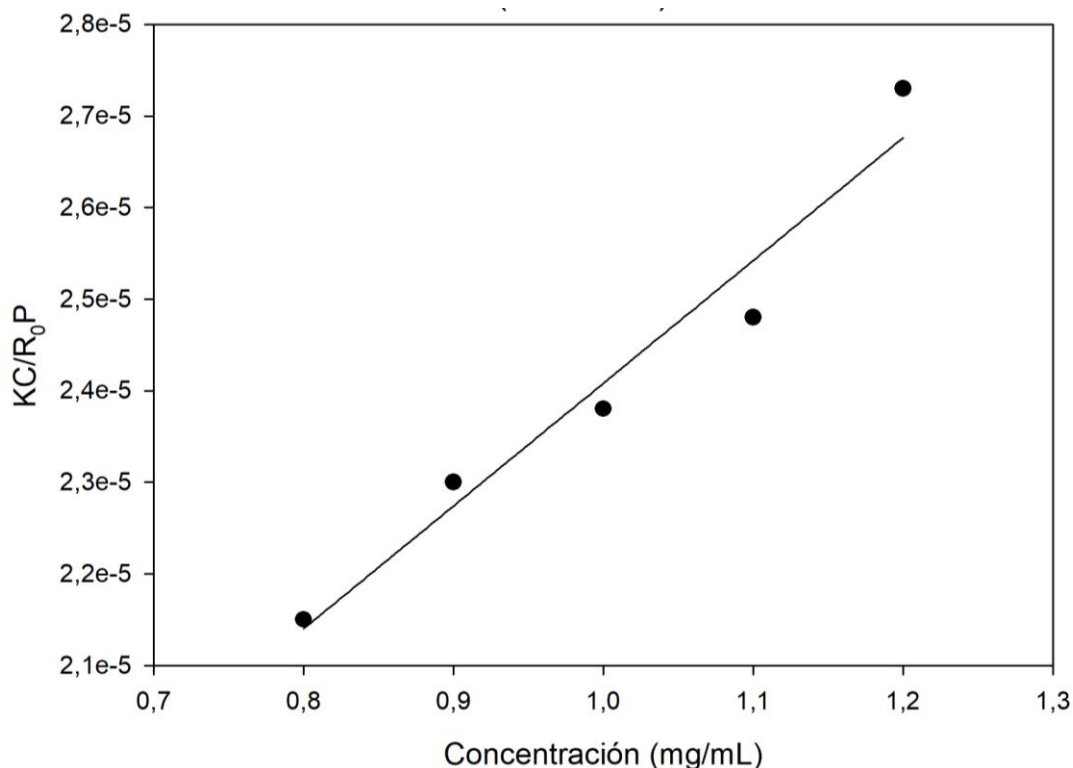


**Figura 5.13. a) espectro de fluorescencia de pireno (longitud de onda de excitación de 335 nm), en un rango de concentraciones de polifruktosa de 0.02 a 1.2 mg/mL; b) Representación de la intensidad de pireno emitida a 373 nm como función de la concentración de polifruktosa.**

Del ajuste de los datos experimentales, a dos rectas de pendientes diferentes (entorno polar, entorno apolar), se deduce el parámetro de CAC para este sistema, que toma el valor de 0.24 mg/mL. Por encima de este valor, el cociente  $I_3/I_1$  toma el valor de 0.95, indicando que el pireno se encuentra en un entorno muy hidrofóbico (interior de la partícula). La presencia de un entorno hidrofóbico asegura que se han formado las partículas.

Este valor de CAC es cinco veces superior al obtenido en el caso de la polifruktosa de origen bacteriano, y, por tanto, se deberían realizar modificaciones de cara a reducir este valor, para una mejor administración sistémica. Es necesaria esta reducción de la CAC porque las nanopartículas encontrarán un volumen grande (toda la circulación sistémica) cuando sean administradas al torrente sanguíneo. Valores elevados de CAC implicarían una desagregación de las partículas, y por tanto, no se apreciarían diferencias comparadas con una administración tradicional (sin sistema de liberación controlada de fármacos).

De igual forma que se realizó anteriormente, se calculó el segundo coeficiente del virial, para las partículas, con el objetivo de estudiar las fuerzas que prevalecían en el coloide (partícula-partícula o partícula-solvente). Este coeficiente se determina desde la pendiente en el ajuste de la ecuación de Raleigh, con los datos experimentales representados en la Figura 5.14.



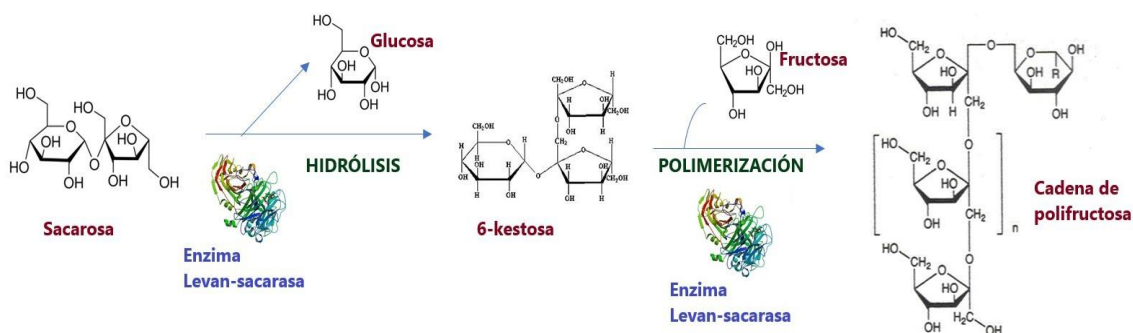
**Figura 5.14.** Representación del gráfico de Debye para la determinación del segundo coeficiente del virial en la polifruetosa obtenida vía enzimática.

En estas nanopartículas, de acuerdo con el cálculo desde la pendiente, el segundo coeficiente del virial toma un valor de  $6.96 \cdot 10^{-6} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ ; que es inferior (medio orden de magnitud) al obtenido de forma microbiana, y al menos un orden de magnitud con respecto a otras micelas poliméricas estudiadas (Uramoto et al., 2016). Este valor más bajo de coeficiente del virial encaja con el incremento experimentado por la CAC (0.24 mg/mL), porque la estabilidad se reduce (es necesario más concentración para aportar estabilidad suficiente al coloide).

Estos resultados van asociados a una disminución del peso molecular como se describió anteriormente. Por tanto, incrementar el peso molecular resultará una estrategia deseable para reducir la CAC, y proporcionar más estabilidad al sistema.

## 4. ESTUDIO DE DIFERENTES PARÁMETROS INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA

Como se ha ido mencionando anteriormente, en la reacción intervienen varios actores, cuya modificación podría condicionar el peso molecular o la producción de polímero. Estos efectos se pueden estudiar a nivel de sustrato, a nivel de catalizador, con la adición de otros sustratos extra, a nivel de temperatura, o por la adición de ciertos elicitors. Concretamente, podrían ser importantes parámetros como la concentración inicial de sacarosa suministrada en el tanque de reacción, las concentraciones de enzima levan-sacarasa, la presencia de azúcares extra en el caldo de reacción (glucosa y lactosa), el efecto de la temperatura, o de la adición de ATP o de ion manganeso. El rol o papel que juegan cada uno de ellos viene resumido en la figura 5.15.



**Figura 5.15. Esquema de la reacción de polimerización de fructosa de forma enzimática. Presencia y papel de los diferentes factores en la reacción.**

De cara a poder controlar el tamaño de partícula, su peso molecular, o su velocidad de producción; se realizaron diferentes series de experimentos tomando en consideración estos efectos que pudiesen



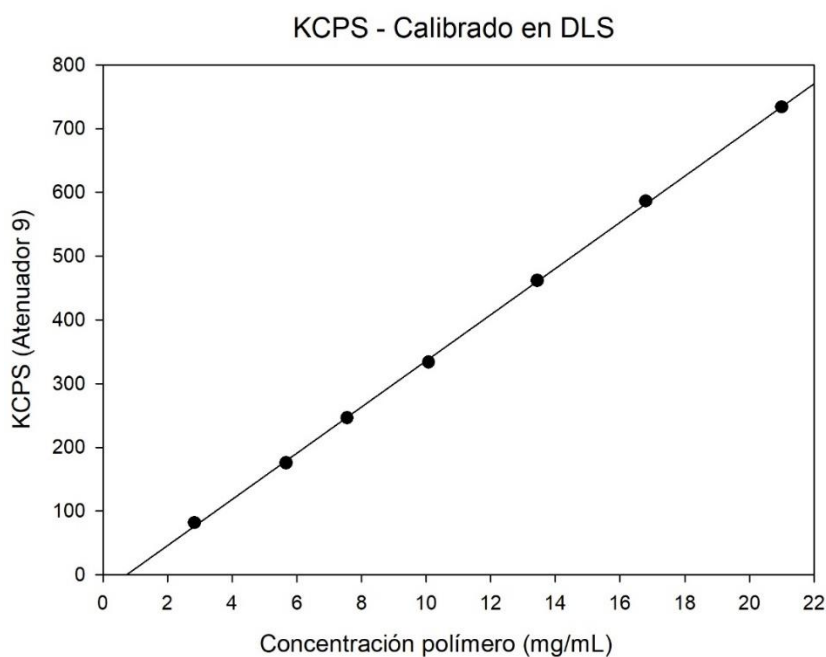
resultar cruciales para un buen control del peso molecular, el tamaño y la producción. Se abordarán en el siguiente orden:

- Efecto de la concentración inicial de sustrato (sacarosa)
- Efecto de la concentración de catalizador (enzima)
- Efecto de la adición de otros azúcares (glucosa y lactosa)
- Efecto de la temperatura
- Efecto de la adición de elicitores (ATP e ion manganeso)

Finalmente, se exploró la posibilidad de utilizar otra materia prima (rafinosa) para la obtención de estas partículas. Los procedimientos empleados y los resultados obtenidos se detallan en las siguientes sub-secciones de este capítulo.

Previamente a estudiar estos efectos, es necesario poner a punto el método de análisis por el que seguir, de forma continua, la producción de polifruktosa y su tamaño en los primeros minutos de la reacción. Como se explicó anteriormente, la técnica DLS es la más indicada para obtener distribuciones de tamaño de partícula de forma rápida, pero, sin embargo, no aporta un valor absoluto de la concentración de partículas en la muestra. Sin embargo, se conoce que la intensidad de luz reflejada en las medidas de DLS es directamente proporcional a la concentración de nanopartículas, y por tanto, de polímero. Realizando un calibrado del equipo, se podrá estudiar la evolución de la concentración de polímero con el tiempo, al estudiar el valor de la intensidad aportado por DLS.

Para realizar este calibrado, se re-suspendió en agua una concentración conocida de polifruetosa (una vez precipitada y purificada previamente), y se realizaron disoluciones seriadas desde ella. Se midió la intensidad de luz (en kilocuentas por segundo – kcps) manteniendo constante el atenuador de señal (Atenuador = 9). Las medidas obtenidas se muestran en la figura 5.16, donde se relacionan con la concentración de polifruetosa.



**Figura 5.16. Recta de calibrado de la concentración de polifruetosa y la señal de intensidad emitida por DLS.**

Sin embargo, esta señal de intensidad no depende solamente de la concentración de polímero, sino que también está relacionada de forma proporcional con el volumen de la nanopartícula al cuadrado, y, por tanto, con el diámetro hidrodinámico de partícula a la sexta (Ecuación 5.1). Por esto, las medidas de intensidad deben ser

relativizadas respecto al tamaño de partícula, dividiendo por el diámetro (en nm) a la sexta (Vysotskii et al., 2009).

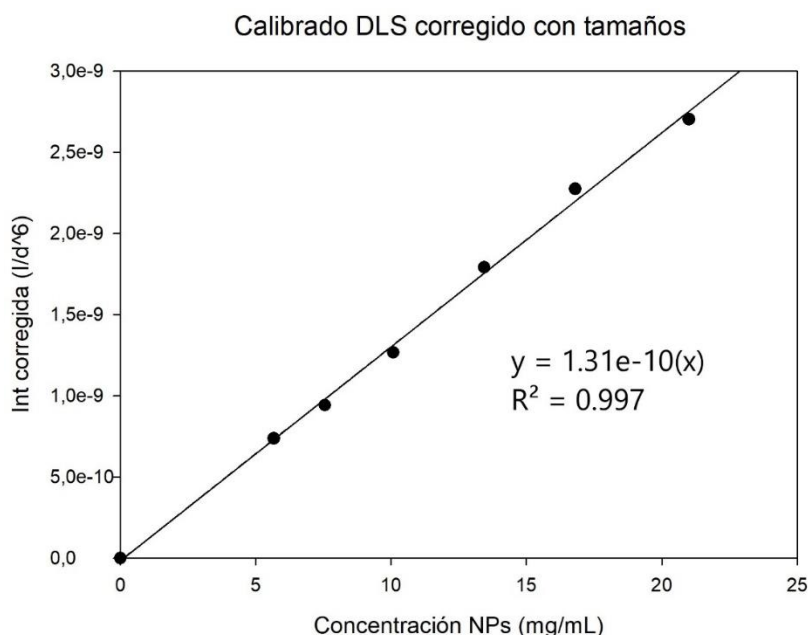
$$I = I_0 \frac{9\pi^2 V^2}{2R^2 \lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) (1 + \cos^2 \theta) \quad (\text{Ec. 5.1.})$$

En la ecuación 5.1.,  $I$  representa la intensidad reflejada,  $I_0$  la intensidad de luz que incide,  $V$  es el volumen de partícula,  $R$  es la distancia entre el punto de observación y la partícula,  $m$  es el índice de refracción del medio (agua en nuestro caso),  $\lambda$  es la longitud de onda de luz (633 nm en este caso), y  $\theta$  es el ángulo entre la luz reflejada y la emitida (173° en este caso). Todos los parámetros son constantes excepto el volumen, que depende del diámetro. Se puede simplificar la ecuación, agrupando el resto de factores en una constante ( $k$ ), y resultando la ecuación 5.2 donde se observa que la intensidad es directamente proporcional al diámetro de partícula ( $d_p$ ) a la sexta.

$$I = I_0 \cdot k \cdot d_p^6 \quad (\text{Ec.5.2.})$$

Por tanto, para conseguir que el calibrado sea independiente del tamaño de partícula, se debe definir una intensidad corregida ( $I_{\text{corr}}$ ) que elimina esa variable, al dividir por el diámetro de partícula a la sexta. En la figura 5.17. se representa la recta de calibrado corregida, donde en el eje de abscisas se muestra ahora la Intensidad corregida [ $I_{\text{corr}}(I/d^6)$ ], frente a la concentración de nanopartículas de polifruetosa en el eje de ordenadas. De esta forma, conociendo por DLS, tamaño e intensidad absoluta, será posible calcular la intensidad relativa, y ésta, a

su vez, permitirá calcular la concentración de polifruktosa presente en cada momento en el medio donde se está produciendo el polímero.

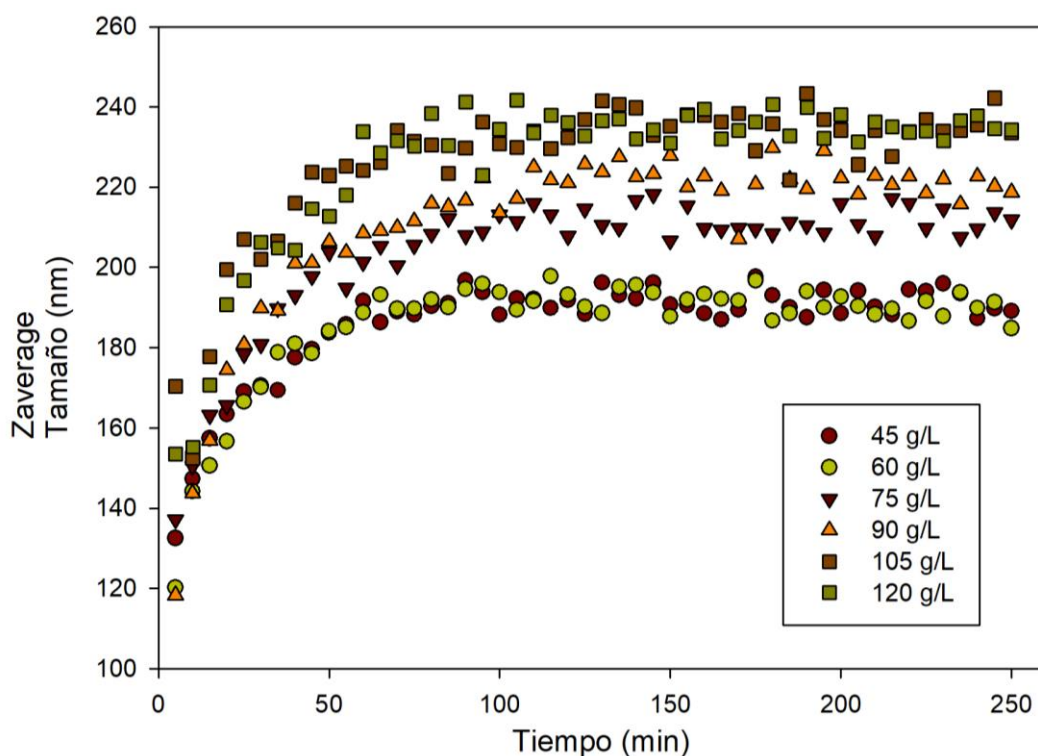


**Figura 5.17. Recta de calibrado que relaciona la Intensidad corregida con la Concentración de NPs de polifruktosa.**

#### 4.1. Efecto de la concentración inicial de sacarosa

La concentración de sustrato suele ser uno de los parámetros más importantes que condicionan las cinéticas enzimáticas, pues la mayoría de ellas, siguen cinética de Michaelis-Menten (con modificaciones), donde la concentración de sustrato es la gran protagonista. A continuación, se presentan las cinéticas de producción de partículas a diferentes concentraciones iniciales de sacarosa.

En un reactor perfectamente mezclado, como el descrito en el apartado 2, se emplearon diferentes concentraciones de sacarosa (45, 60, 75, 90, 105, 120 g/L) manteniendo constante la temperatura (37°C) y la concentración de enzima (0.2 ppm). Se siguió la reacción por DLS, como se ha explicado en el apartado anterior, tomando medida cada 5 minutos de su tamaño (Z-average) y su intensidad. Se corrigieron las intensidades de acuerdo con la ecuación 5.2, y se estimó la concentración siguiendo el calibrado de la figura 5.17. A continuación, se representan los datos obtenidos, tanto de diámetro (Figura 5.18.) como de concentración de nanopartículas (Figura 5.19.) con respecto al tiempo, en las primeras horas de reacción.



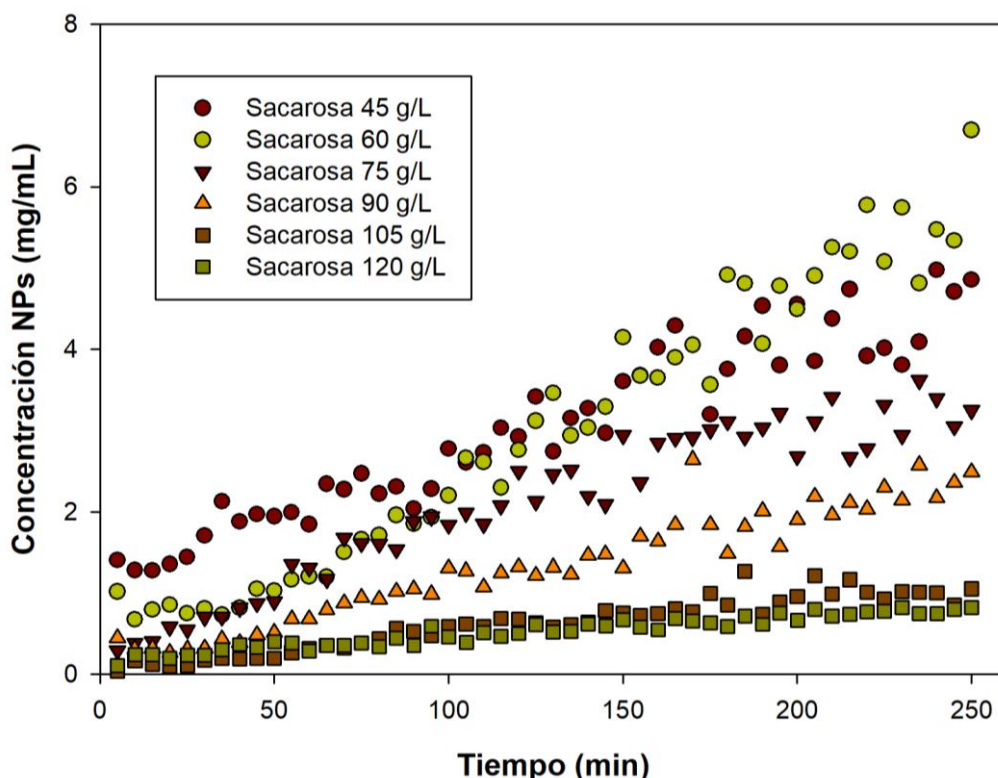
**Figura 5.18. Efecto de la concentración de sacarosa en el tamaño de las nanopartículas producidas de forma enzimática.**

En la figura 5.18 puede observarse que hay un efecto de la concentración inicial de sacarosa en el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Concretamente, las partículas más pequeñas se obtienen a bajas concentraciones, y el tamaño aumenta hasta 240 nm cuando se superan los 100 g/L. Sin embargo, se observa que el tamaño se encuentra controlado en el rango 170 a 240 nm, puesto que no hay diferencias en los diámetros de las concentraciones 45-60 g/L y 105-120 g/L. En todos los casos, alcanzar el tamaño máximo de partícula se convierte en un proceso muy rápido, que dura apenas una hora, y que sigue la misma cinética para todos los casos como se demostrará en capítulos siguientes. Estos datos serán modelados, y se determinarán las constantes en el capítulo 6.

De la misma forma, es necesario estudiar si las diferencias de tamaño son realmente significativas, y, por tanto, se puede concluir que la concentración inicial de sacarosa tiene un efecto significativo en el tamaño de partícula. Para ello, se compararon por pares los últimos 15 tamaños de cada concentración presentados en la figura 5.18; y se realizó con ellos un estadístico T, estableciendo el nivel de la significancia en el 99%. Los cálculos detallados se muestran en el anexo I. Las conclusiones de los test estadísticos indican que hay diferencia significativa en los tamaños entre todas las concentraciones iniciales excepto entre 45 y 60 g/L, y entre 105 y 120 g/L. Estas dos excepciones refuerzan la teoría de unos límites de concentración tanto superior e inferior, que acotan el rango de tamaños obtenidos.

En la figura 5.19. se representan la evolución de las concentraciones de nanopartículas de polifrutosa con el tiempo.

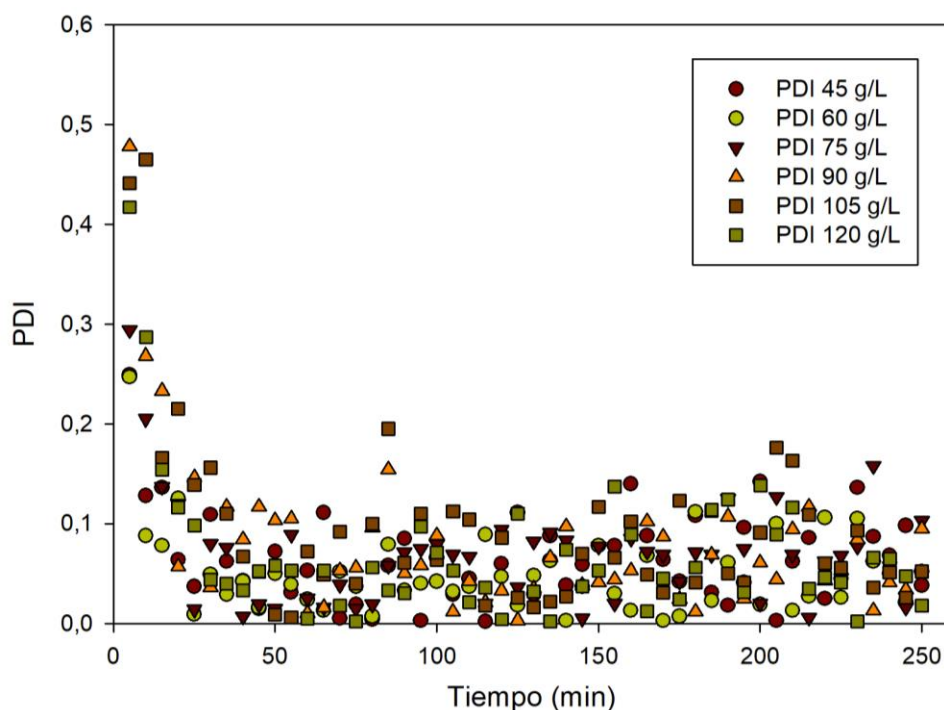
Analizando la figura, se observa cómo existe una clara inhibición por sacarosa, dado que las concentraciones más altas ofrecen las peores velocidades iniciales de catálisis.



**Figura 5.19. Efecto de la concentración inicial de sacarosa en la producción de nanopartículas de polifruktosa por vía enzimática.**

Sin embargo, se obtienen las mejores velocidades de reacción para las concentraciones más bajas ensayadas, 45 y 60 g/L. A pesar de estas claras diferencias, cuando se detiene la reacción a 48 horas, y se precipita el polímero, los rendimientos de reacción son semejantes (en torno al 20% de conversión de sacarosa en polímero). Estas cinéticas también serán modeladas en el capítulo 6, donde se podrá estudiar cómo existe una inhibición por sustrato, y se obtendrán los parámetros asociados a ella.

Esta formación de nuevas nanopartículas con el tiempo, lleva asociada una variación en la distribución de las mismas, que puede ser estimada con el valor de la polidispersión (entre 0 y 1). Este valor indica cómo de diferentes son los tamaños de las nanopartículas presentes en la muestra (cuanto más próximo a 0, más semejantes son entre ellas, más monodispersión). En la figura 5.20 se representa, para cada concentración, la evolución de este parámetro con el tiempo, durante la reacción enzimática. Como se puede observar, existe un elevado grado de dispersión (entre 0.25 y 0.50) en los primeros minutos de la reacción enzimática, independientemente de la concentración inicial de sustrato; que se va reduciendo hasta alcanzar un valor estable, situándose por debajo de 0.1, lo que puede considerarse como partículas monodispersas.

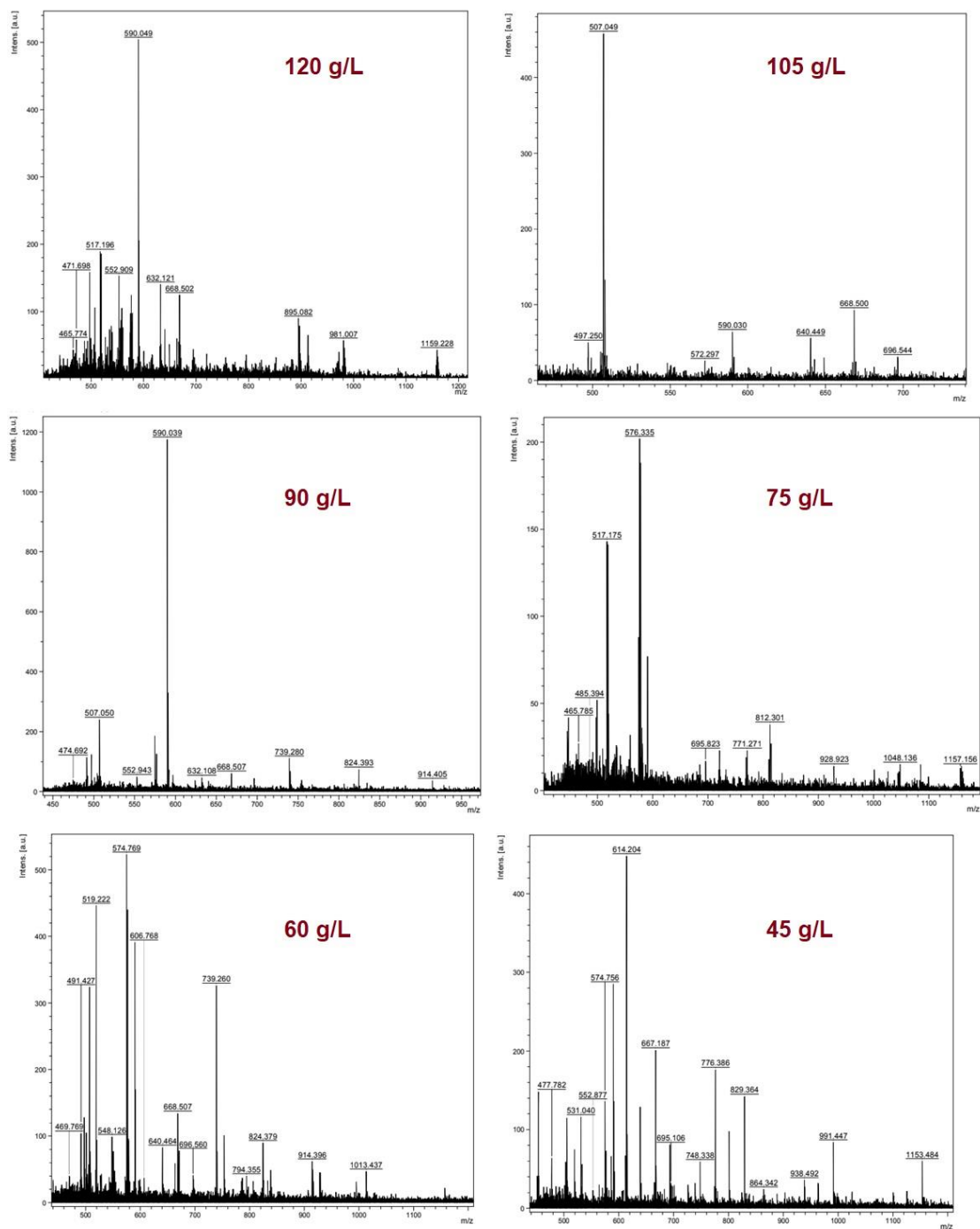


**Figura 5.20. Evolución de la polidispersión (PDI) con el tiempo, para las diferentes concentraciones de sacarosa en la producción enzimática de polifruktosa.**



Una vez terminada la reacción, a 48 horas, el polímero es precipitado y secado como se explicó anteriormente, y su peso molecular puede ser estimado, como se vio en el capítulo anterior, por espectrometría de masas MALDI-TOF. De esta forma, es posible determinar si la concentración de sustrato tiene un efecto importante en el peso molecular de las cadenas. Los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones se muestran en la Figura 5.21, donde se puede apreciar que no existen diferencias significativas en el peso molecular de las cadenas en función de la concentración de sacarosa inicial.

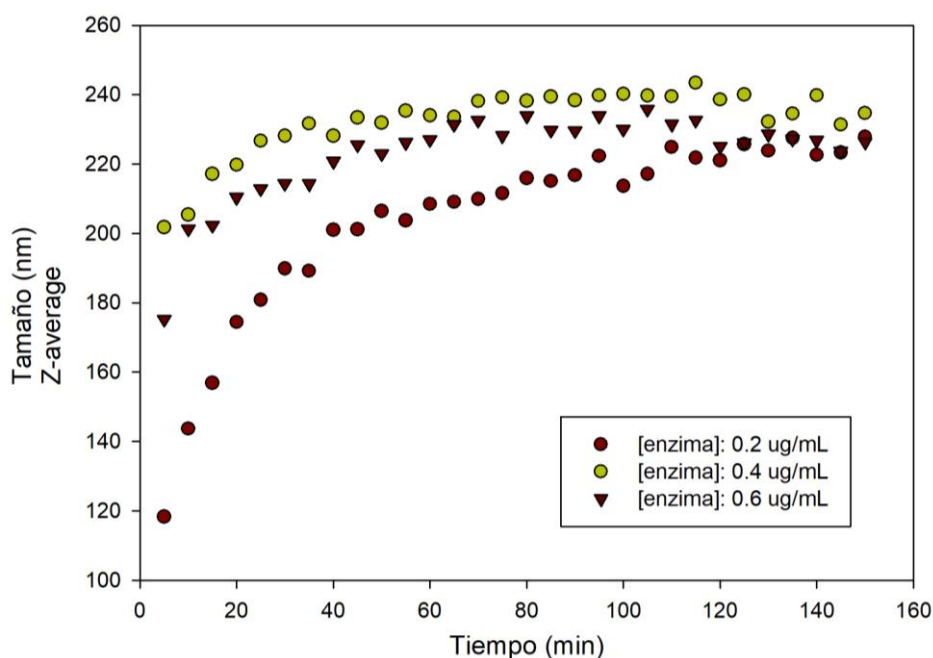
En definitiva, en este apartado se ha comprobado que la concentración inicial de sacarosa controla el tamaño y la velocidad de producción, pero no presenta relevancia en cuanto a la longitud de las cadenas de polifruktosa, al ser medidas por MALDI-TOF.



**Figura 5.21. Espectros de masas para cada una de las diferentes concentraciones iniciales de sustrato.**

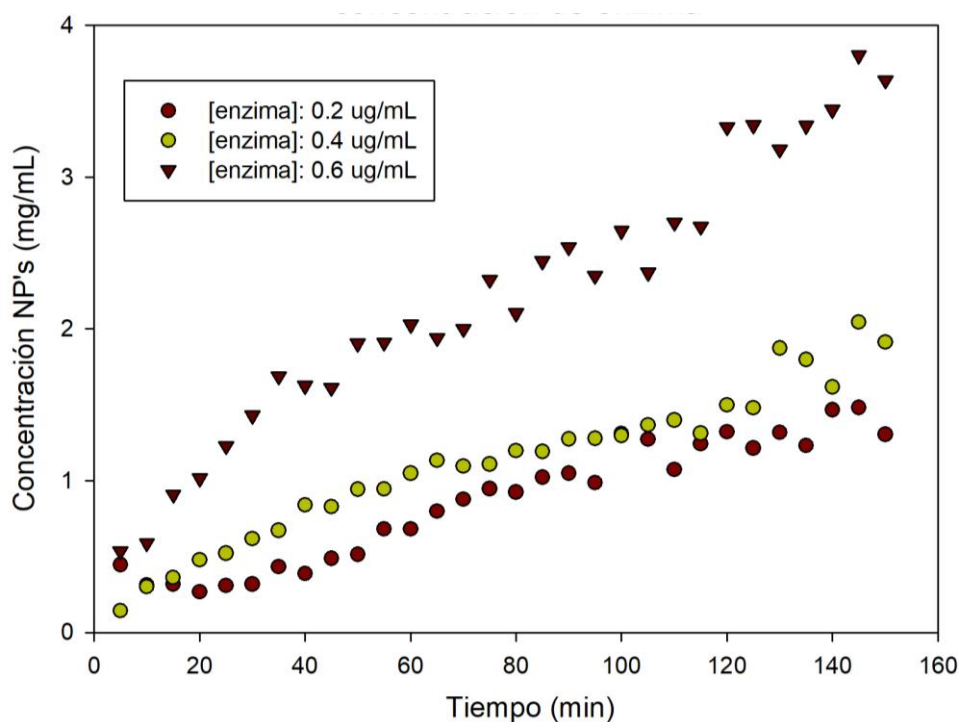
## 4.2. Efecto de la concentración de enzima

Algunos autores (Raga-Carbajal et al., 2016) han reportado, que la proporción relativa de enzima expresada en ciertos microorganismos podía modificar la actividad de la misma. Por esta razón, se ensayaron 3 concentraciones diferentes de enzima (0.2, 0.4 y 0.6 ppm), y se estudió la evolución del tamaño de partícula y la concentración de partículas con el tiempo; manteniendo constante la concentración inicial de sacarosa (90 g/L). En la Figura 5.22 se representan los tamaños obtenidos con las diferentes concentraciones de enzima, donde se observa que se alcanzan los mismos tamaños de partículas independientemente de la cantidad de enzima. Sin embargo, la velocidad para alcanzar ese diámetro máximo varía, siendo mayor cuanto mayor es la concentración de enzima dispuesta en la reacción.



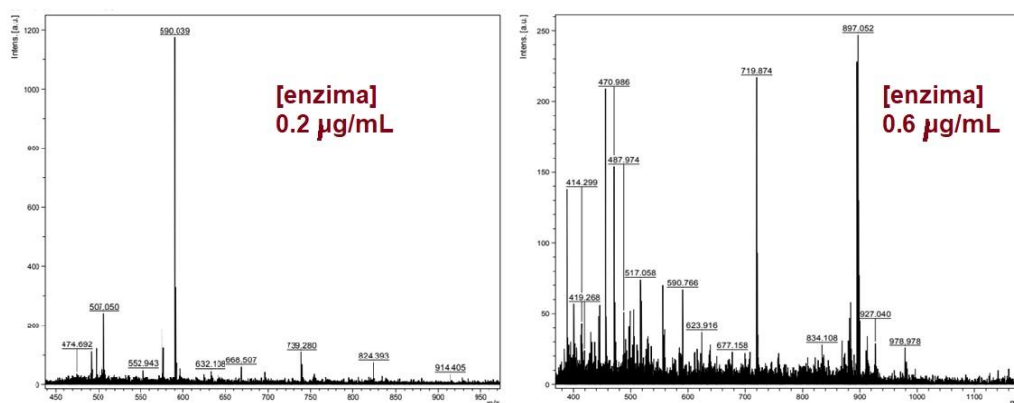
**Figura 5.22. Efecto de la proporción relativa de enzima en el tamaño de las nanopartículas de polifruktosa producida de forma enzimática.**

En la Figura 5.23 se muestra la concentración de nanopartículas con el paso del tiempo (con los datos obtenidos desde DLS), utilizando el mismo calibrado que el presentado en la sección 4.1. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en la velocidad de producción entre las concentraciones de enzima de 0.2 y 0.4 ppm, mientras que sí se observa un gran crecimiento cuando se añaden 0.6 ppm de levan-sacarasa a la reacción. Esta diferencia es explicable por la propia cinética de Michaelis-Menten que presentan las enzimas, donde la cantidad de catalizador (enzima) presente condiciona la velocidad máxima alcanzable ( $V_{\max}$ ), y con ello, la velocidad global de reacción.



**Figura 5.23.** Evolución de la producción de nanopartículas con el tiempo a diferentes proporciones relativas de enzima en la reacción.

Finalmente, se determinaron los pesos moleculares por espectrometría de masas MALDI- TOF. En la Figura 5.24 se representan los espectros, donde se observa un incremento en el pico principal de la cadena según se aumenta la concentración. Concretamente, con 0.6 ppm, se alcanza un tamaño de unos 700-900 Da para cada cadena (dos picos principales: 714 y 897 Da), algo que supone incrementar al menos un 50% el peso molecular con respecto al caso base (0.2 ppm).



**Figura 5.24. Espectros de masas, obtenidos por MALDI-TOF para dos concentraciones diferentes de enzima en la reacción (0,2 y 0,6 µg/mL)**

Incrementar el peso molecular supone una ventaja, pues como se ha descrito anteriormente, existe una relación entre este parámetro y la CAC. Al aumentar el peso molecular se reduce la CAC, las partículas son más estables, y, por tanto, los fenómenos de desagregación al introducirse en el torrente sanguíneo serían menos probables.

Como conclusión a esta sección, podría decirse que la proporción enzima-sustrato condiciona la velocidad de catálisis, y el peso molecular de las cadenas sintetizadas, aumentando el número de residuos de fructosa por cadena. Esto puede explicarse por la teoría defendida por Raga-Carbajal et al. (2016) donde una concentración relativa de enzima elevada puede reducir la actividad levansasa de la propia enzima, evitando hidrolizar el propio producto que se está sintetizando.

### **4.3. Efecto de la adición de otros azúcares**

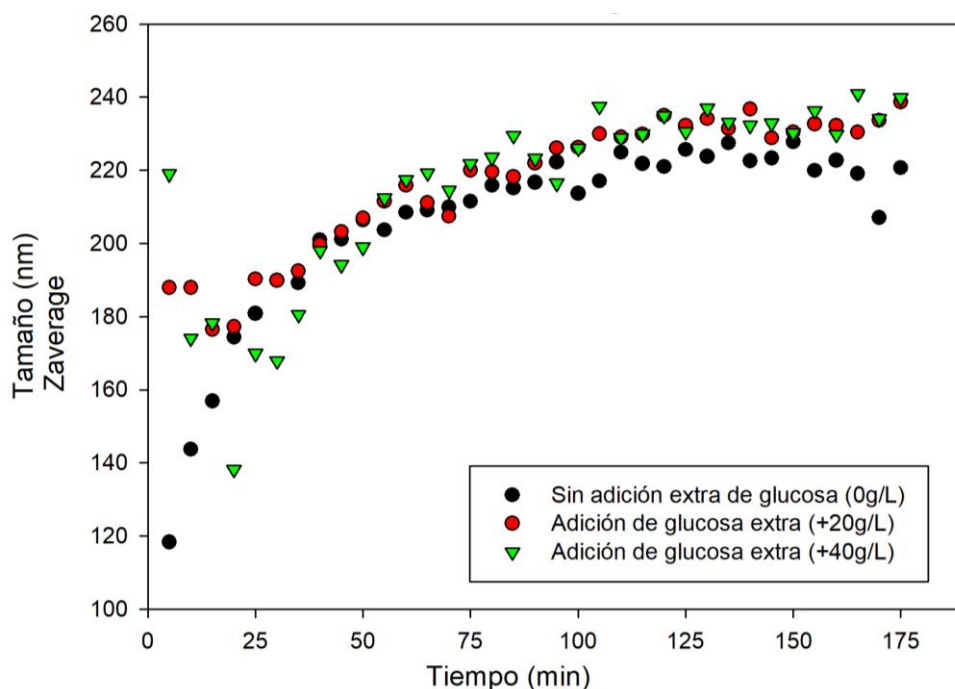
La presencia de otros azúcares en el medio puede afectar a la catálisis enzimática, como algunos autores han comentado, y también se describió en el capítulo anterior para el caso de la glucosa. Esta presencia de otros azúcares podría tener efecto tanto en la producción como en el tamaño de partícula. Es por esta razón, por lo que, en esta sección, se procederá a estudiar el efecto de la adición extra de dos azúcares (glucosa y lactosa), conservando constante la concentración inicial de sacarosa en 90 g/L y la concentración de enzima en 0.2 ppm, como herramienta de comparación con los resultados anteriores. Los resultados pondrán de manifiesto si la adición extra de estos azúcares genera cambios en la velocidad de producción de polifrutosa, o en el tamaño de las nanopartículas obtenidas.

#### **4.3.1. Efecto de la adición de glucosa extra**

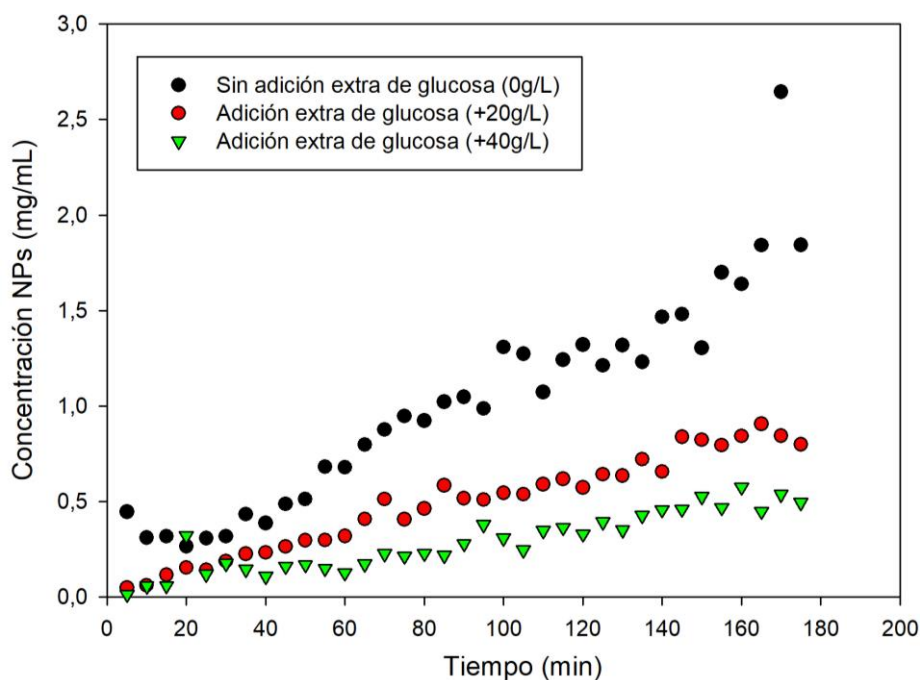
En el capítulo anterior (cuatro), se describió cómo la glucosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa tenía un efecto inhibitorio en la

síntesis de polifruktosa, y cómo este hecho explicaba también las diferencias en las cinéticas entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por esta razón, se consideró relevante estudiar si la glucosa también sería responsable de la inhibición a nivel enzimático, al añadir concentraciones crecientes de glucosa al medio de reacción (20 y 40 g/L), que ya contiene 90 g/L de sacarosa, y 0.2 ppm de enzima.

Los resultados relativos al tamaño se observan en la figura 5.25, donde se puede comprobar que no existe diferencia en el tamaño medio de partícula por la presencia de este azúcar extra en el medio. Sin embargo, si atendemos a los resultados obtenidos del estudio de la producción, que se recogen en la figura 5.26, se observa cómo la glucosa actúa como inhibidor de la síntesis de polifruktosa.



**Figura 5.25. Evolución del tamaño de las partículas cuando se añaden diferentes concentraciones de glucosa extra al medio de reacción.**



**Figura 5.26. Evolución de la concentración de nanopartículas bajo diferentes concentraciones de glucosa en el medio de reacción.**

Estos resultados explicarían también los resultados obtenidos anteriormente con la variación de concentración de sacarosa (sección 4.2 de este capítulo). Debido a la reacción de hidrólisis, cuanto más concentración de sacarosa exista en el medio, más concentración de glucosa será liberada. En dicha sección, se observaba una inhibición por la concentración de sacarosa inicial, que, a raíz de estos resultados, también puede ser explicada por el exceso de glucosa en el medio de cultivo. Estos experimentos sugieren la posibilidad, de acoplar una reacción paralela, destinada a la eliminación/transformación de la glucosa, evitando que pueda intervenir como inhibidor de la catálisis.

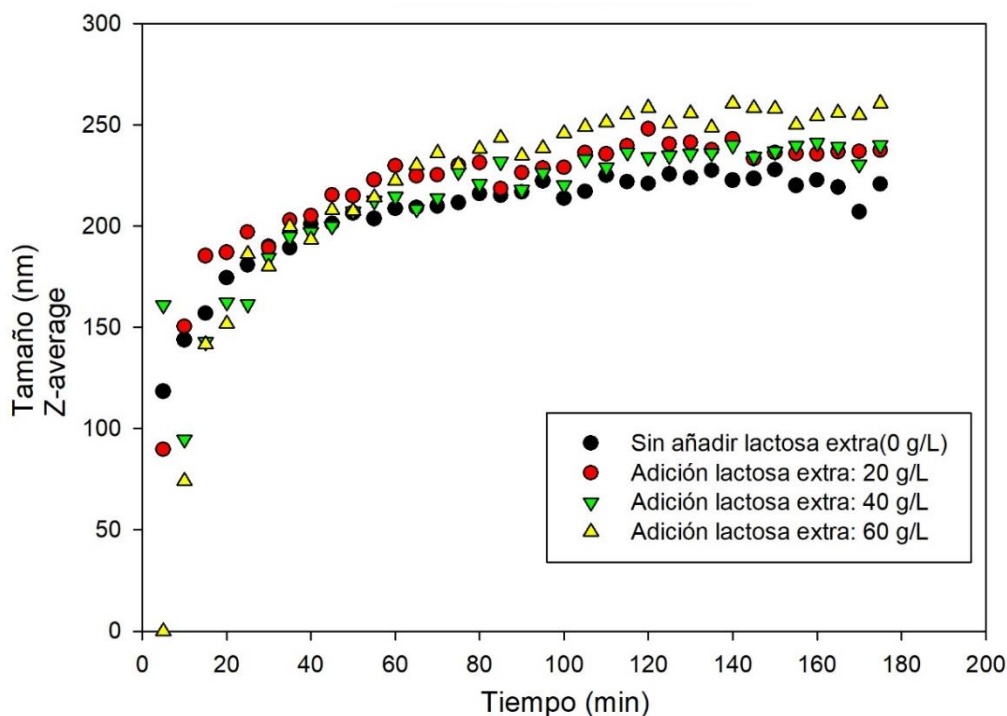


#### **4.3.2. Efecto de la adición de lactosa extra**

Varios autores han indicado, que es necesaria la hidrólisis de un disacárido o trisacárido, para obtener energía suficiente que ayude en la polimerización de las fructosas (Goldman et al., 2008). Sin embargo, no se ha concretado si la energía necesaria para la polimerización debe provenir del hidrólisis de la sacarosa, o podría venir de otro disacárido. Por esta razón, para clarificar el concepto, se realizaron estudios donde se adicionaron diferentes cantidades de lactosa (20, 40, 60 g/L) al medio de reacción base.

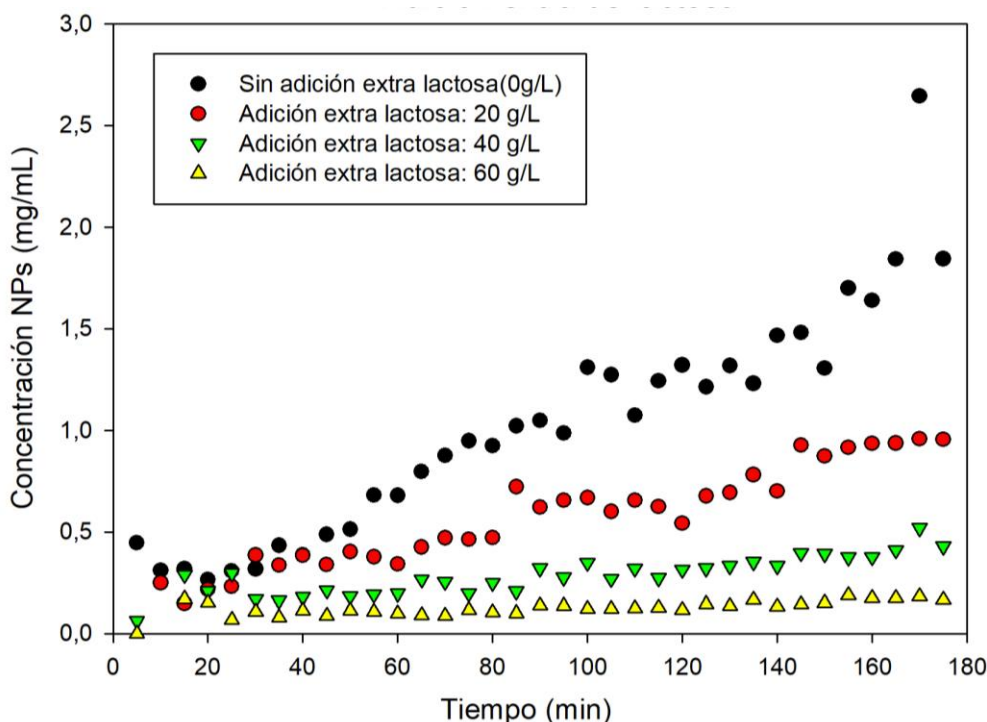
La hipótesis de trabajo, por la que se selecciona la lactosa es la siguiente: la lactosa es un azúcar compuesto por galactosa y glucosa, unidas por enlace  $\beta(1-4)$ . Al ser un enlace semejante al de la sacarosa, se plantea la posibilidad que la enzima levan-sacarasa fuese capaz de hidrolizar de forma inespecífica el enlace (promiscuidad enzimática), y utilizar la energía para polimerizar la fructosa obtenida de la reacción de hidrólisis que ocurre de forma paralela (desde la sacarosa). De esta forma, se estaría también produciendo polifrutosa con un aporte extra de energía.

En la Figura 5.27 se muestra la evolución de los diámetros de nanopartículas con el tiempo, y en la Figura 5.28 la evolución de la cantidad de nanopartículas con el tiempo, a diferentes concentraciones de lactosa extra adicionada a la reacción.



**Figura 5.27. Evolución del tamaño de las nanopartículas de polifruktosa tras la adición extra de diferentes concentraciones de lactosa.**

Como se puede observar en la Figura 5.27, el diámetro de las nanopartículas experimenta un ligero ascenso comparado con el caso base, a medida que se va incrementando la cantidad de lactosa adicionada. Sin embargo, es una variación bastante pequeña, que podría explicarse incluso solamente por las variaciones en el índice de refracción del medio debido a la presencia de un azúcar como lactosa, que produce cierta turbidez en el medio de reacción.



**Figura 5.28. Evolución de la concentración de partículas de polifruktosa con diferentes concentraciones de lactosa en el medio de reacción.**

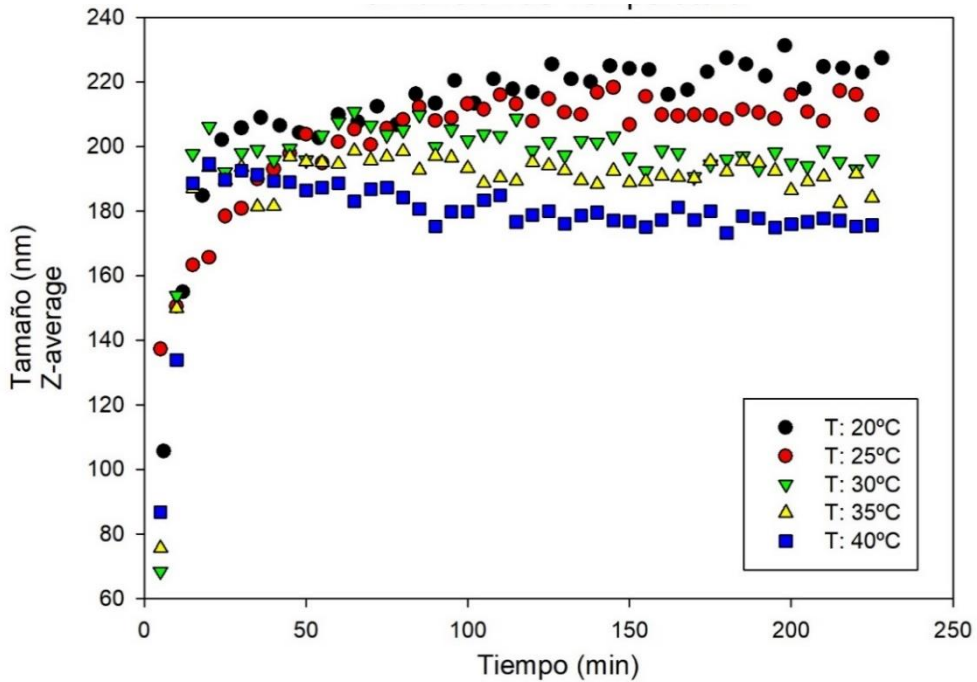
Por otra parte, en la figura 5. 28 se observa una inhibición de la producción de partículas en presencia de lactosa. Esta inhibición podría ser producida por la glucosa resultante de la hidrólisis de la lactosa, dado que el comportamiento es semejante a la figura 5.26. Esto implicaría que sí ocurre una hidrólisis de la lactosa, y, por tanto, un aporte extra de energía al sistema. Sin embargo, la glucosa libre intervendría negativamente en la catálisis, y el posible efecto positivo, por aporte de energía, que tendría la adición de lactosa, quedaría contrarrestado por la fuerte inhibición de la glucosa como sub-producto de la reacción.

En el anexo I se muestra el test estadístico realizado para comprobar la significancia o no de la adición de azúcares extra en la producción de polímero. De acuerdo con los resultados obtenidos, es estadísticamente significativa la adición de glucosa y lactosa en cuanto a la producción de polímero, pero no hay significancia en cuanto al tamaño de partícula.

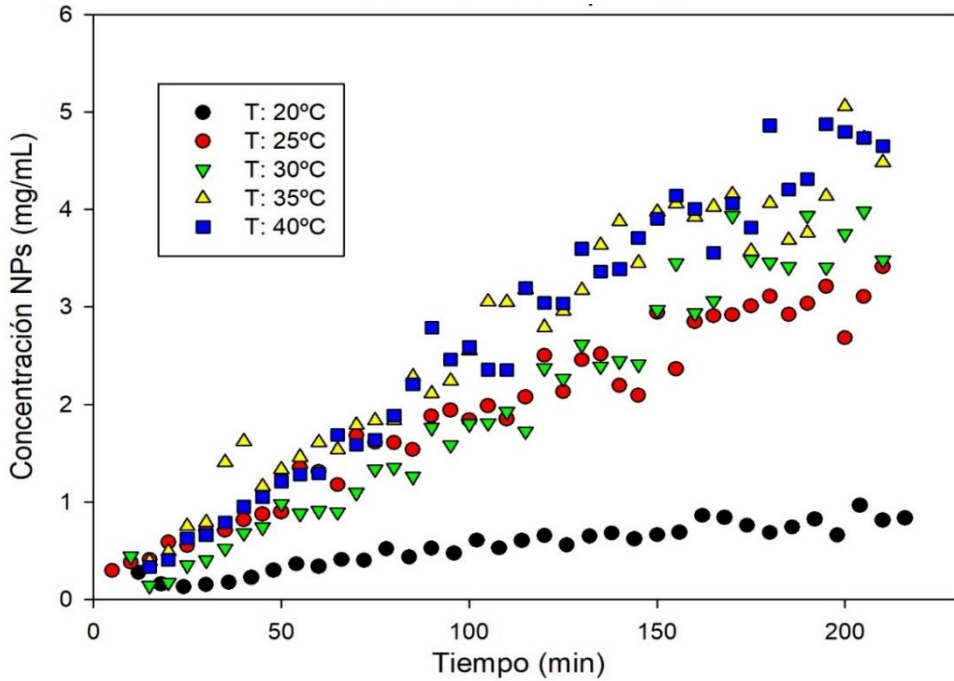
#### **4.4. Efecto de la temperatura**

El efecto de la temperatura suele ser uno de los parámetros más importantes a analizar cuando se trabaja con enzimas y con polímeros. Relacionado con este parámetro, se estudió el efecto de la temperatura en dos sistemas: en el proceso de síntesis; y en la estabilidad de las partículas a diferentes temperaturas.

Para el primer caso, en el reactor termostatzado, se realizaron experimentos de catálisis, con concentraciones constantes de enzima (0.2 ppm) y sustrato (90 g/L de sacarosa), a diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40°C), y se determinó mediante DLS, el tamaño y la concentración de las partículas. Los resultados obtenidos se encuentran representados en las Figuras 5.29 y 5.30 respectivamente.



**Figura 5.29.** Evolución del tamaño de partícula en función de la temperatura de reacción.

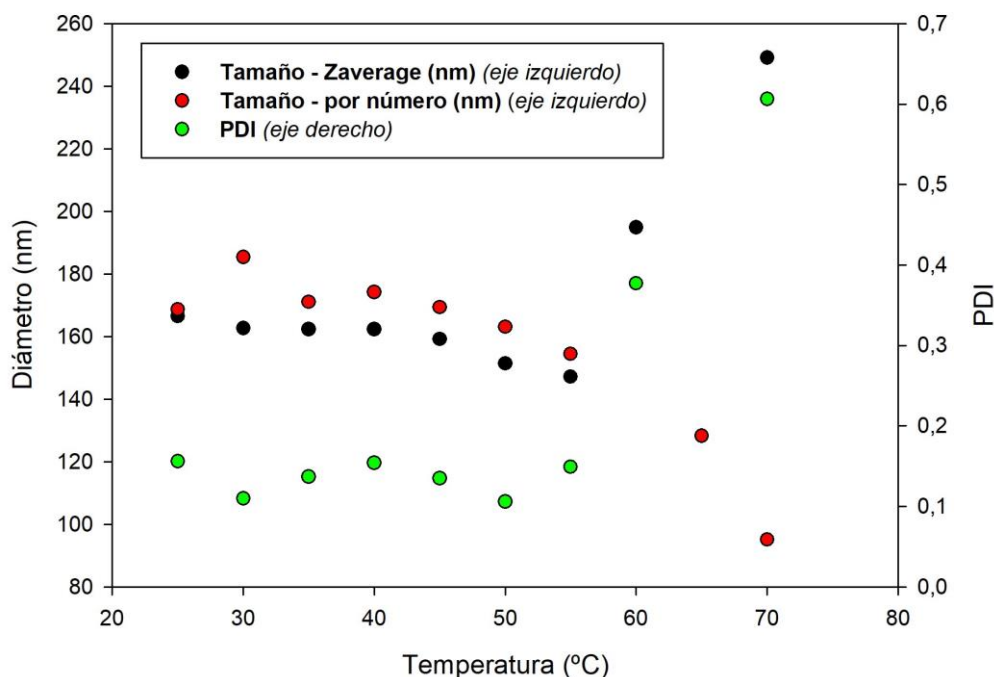


**Figura 5.30.** Evolución de la concentración de nanopartículas al ser producidas de forma enzimática a diferentes temperaturas.

En la Figura 5.29 se observa la evolución de los diámetros obtenidos en cada experimento, y se puede concluir que la temperatura no condiciona el tamaño de partícula obtenido. De igual forma, tampoco se observaron diferencias reseñables en cuanto al peso molecular de las cadenas, en las diferentes condiciones de temperatura.

En la Figura 5.30 se observa la presencia de un máximo entre 35 y 40°C, dado que a medida que se incrementa la temperatura, la velocidad de catálisis se observa que aumenta, hasta 40°C donde vuelve a ser inferior. Este resultado sugiere la existencia de una temperatura óptima para la producción, que se ha fijado en 37°C (por analogía con la temperatura corporal). De igual forma, esta ha sido la temperatura predicha por otros autores, para la producción de polifruktosa, en otras condiciones o mediante el uso de microorganismos (Poli et al., 2009; Shih et al., 2005).

Una vez estudiado el efecto de la temperatura durante la síntesis, se procedió a estudiar la estabilidad de las nanopartículas producidas. Así, una vez precipitado el polímero, se dispersó en agua a una concentración de 1.2 mg/mL (de tal forma que, conociendo el valor de la CAC, se asegurase una completa reorganización en agua), y se dispuso en una cubeta de DLS, donde fue sometido a medidas sucesivas mientras se incrementaba la temperatura progresivamente. Cada 5°C de temperatura, se volvía a medir la distribución de tamaño, en un rango entre 25°C y 70°C (en un proceso estandarizado por el equipo, y conocido como rampa de temperatura). La evolución de los tamaños obtenidos se muestra en la Figura 5.31.



**Figura 5.31. Respuesta de las nanopartículas de polifruktosa a la temperatura. Eje izquierdo: tamaño de las partículas. Eje derecho: Índice de polidispersión.**

En la figura 5.31 se puede apreciar cómo las partículas mantienen su estabilidad sin modificaciones reseñables hasta los 50°C. Los valores de los diámetros, (tanto Z-average, como el estimado en número) se mueven en un rango de 20 nm, entre 160 y 180 nm. Sin embargo, cuando se supera esta barrera, comienza la inestabilidad de los mismos, produciéndose un descenso brusco del tamaño de partícula medida en número, y un aumento importante del tamaño de partícula medido en Z-average.

Esto puede explicarse con la aparición de agregados que se originen por una reorganización de las cadenas, causadas por el incremento de la temperatura. Esta hipótesis se ve reafirmada por el

incremento que experimenta la polidispersión (PDI) a partir de esa temperatura (hasta entonces, estable alrededor de 0.1).

Concretamente, a 70°C, se ha perdido la monodispersión por completo (el valor de PDI supera 0.6) y los tamaños son muy diferentes según el diámetro que se considere. El valor de Z-average alcanza 250 nm, mientras que el tamaño en número es menor de 100 nm. Todo esto indica la presencia de fragmentos y agregados en la suspensión de nanopartículas.

#### **4.5. Efecto de la adición de ATP**

La reacción de transfructosilación (polimerización de residuos de fructosas), descrita en la figura 5.1 es una reacción endotérmica, es decir, precisa de energía para poder ejecutarse. Esta energía se obtiene del hidrólisis del disacárido sacarosa en glucosa y fructosa, aportando energía para la polimerización. Sin embargo, esta energía puede resultar insuficiente, y la reacción se detiene cuando ya no es energéticamente viable continuar (Chambert y Gonzy-Treboul, 1976). En el caso de los microorganismos, éstos pueden aportar energía extra a la reacción para que produzca cadenas más largas si lo estima necesario. Este aporte suele llegar en forma de ATP (Adenosin trifosfato), moneda energética de los organismos.

En esta sección se procederá a estudiar el efecto de la adición de ATP en la reacción de producción de levan. Concretamente, se abordará si suplementar el medio de reacción con ATP modifica el tamaño, el número de partículas, y, sobre todo, el peso molecular, dado



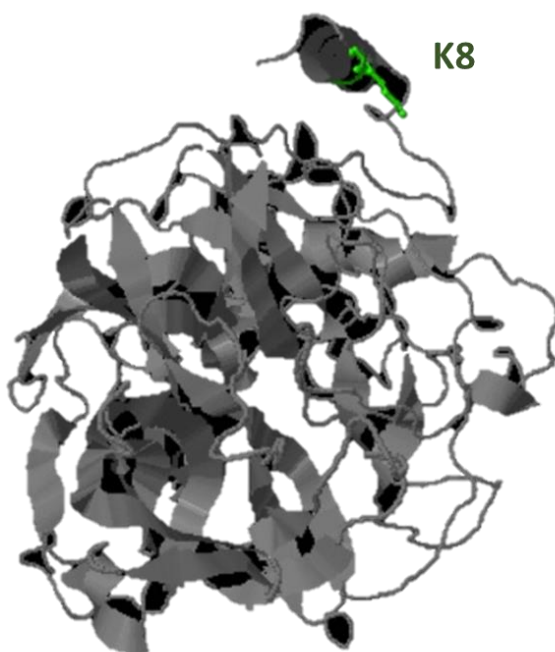
que, si se alargan más las cadenas, se reducirá el valor de CAC, lo cual resulta interesante para su administración sistémica.

Para que la adición de ATP resulte efectiva es necesario probar la presencia de un lugar en la enzima, de unión a ATP con cierta actividad fosfatasa. Algunos autores (Crutz et al., 1990) publicaron la relación que existe entre la fosforilación de sustratos y la expresión de la enzima levan-sacarasa. Es decir, se probó un mecanismo de control de expresión de la enzima en función de la presencia o no de sustratos como ATP. Sin embargo, esto es un estudio a nivel de expresión génica, y no menciona la existencia del mencionado lugar de unión.

Para obtener esta información, se procedió al estudio bioinformático de la misma, utilizando el método planteado por Hu et al. (2018), que combina el perfil de secuencias y la estructura de la proteína. Como el ligando es conocido, se estudian las probabilidades de que una con algún residuo expuesto de la proteína. Para obtener estos valores de probabilidades, se tomó la secuencia de la proteína levan-sacarasa (P05655) obtenida desde Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), y se utilizó el software dispuesto por el “*Center for Computational Medicine and Bioinformatics*” de la Universidad de Michigan (Estados Unidos de América).

Los resultados arrojados por la simulación (ver anexo II), señalan la existencia de una región en la proteína, con alta afinidad por ATP (alta probabilidad de unión), que se concreta en el residuo Lisina 8, que sería el lugar por donde previsiblemente interaccionaría el ATP en la enzima. Esta interacción aportaría energía extra para la

polimerización. Tras la simulación de la estructura, se representa en la figura 5.32 el aminoácido encargado de la interacción con ATP. Como se puede observar, se encuentra en el exterior de la estructura terciaria de la proteína, en un lugar accesible.

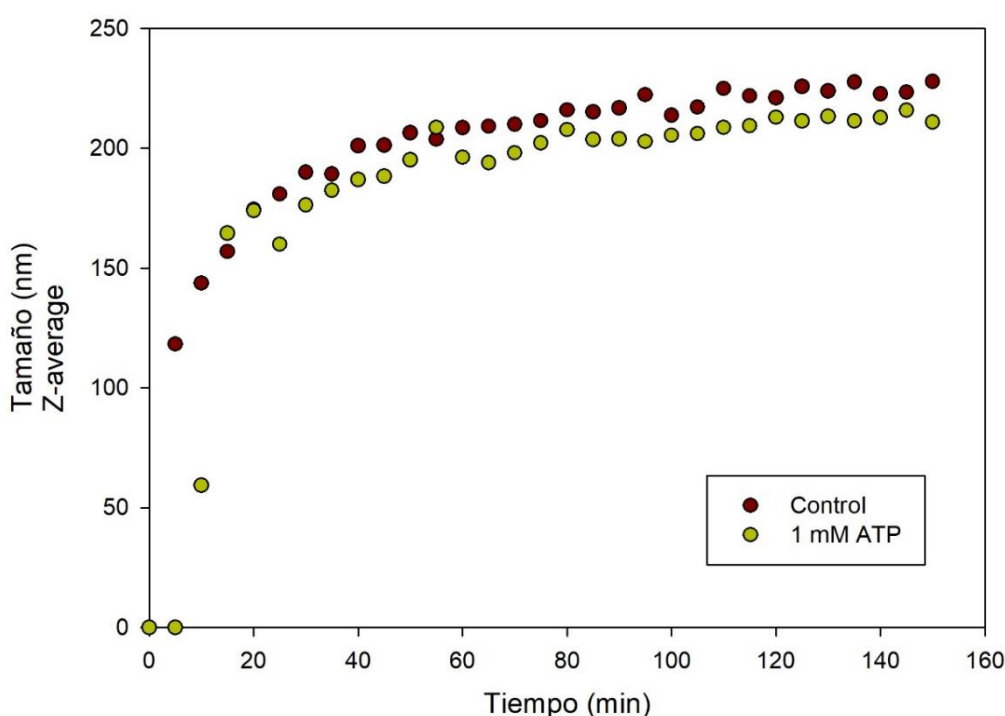


**Figura 5.32. Simulación de la estructura terciaria de la proteína leván-sacarasa y del residuo de interacción con ATP (en verde).**

Por la simulación bioinformática ha quedado probada la presencia de un sitio de unión a ATP. Por esta razón, se realizó un experimento de síntesis de polifruktosa, utilizando el caso base (90 g/L de sacarosa, 37°C y 0.2 ppm enzima) y adicionando 1 mM de ATP al caldo de reacción. Se siguió la evolución de la reacción por DLS, analizando tamaño de partícula e intensidad (proporcional a la concentración de nanopartículas), que se representan en las figuras 5.33

y 5.34 respectivamente, junto con las curvas obtenidas con el mismo caso, pero sin la adición de ATP.

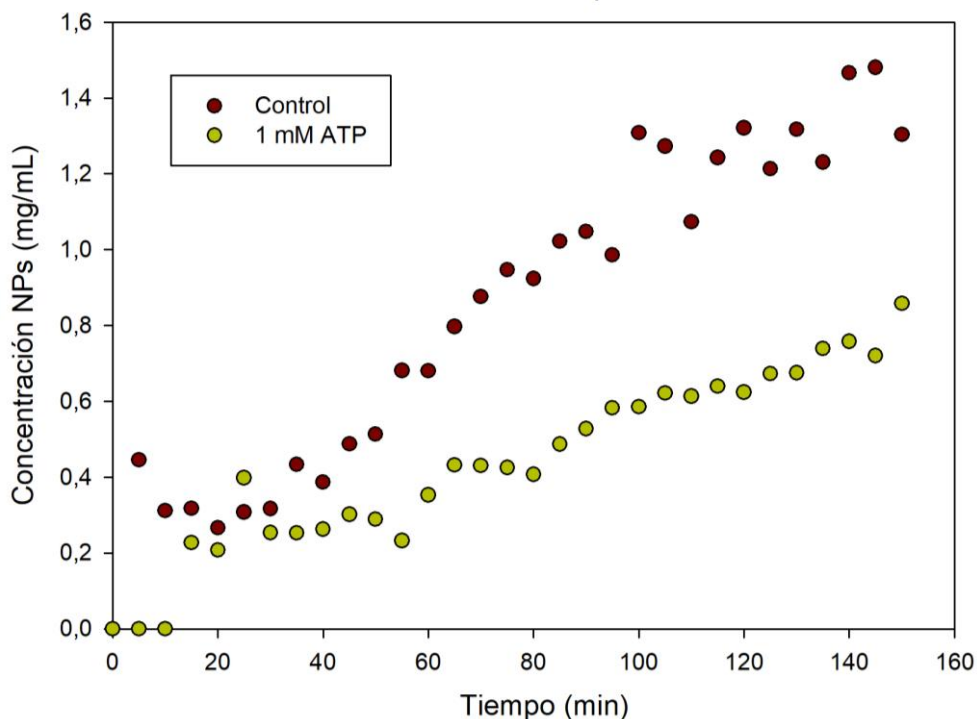
Del análisis de los tamaños de partícula (Figura 5.33.), se observa una ligera reducción en el tamaño medio de partícula, aunque la progresión en el crecimiento del tamaño es la misma (velocidad en la que se alcanza su tamaño máximo). Se estima una reducción de unos 10 nm en el tamaño medio de las partículas, que no se considera significativo (dentro de la desviación estándar de la medida).



**Figura 5.33. Efecto de la adición de ATP en el tamaño medio de las nanopartículas de polifruktosa.**

Analizando la producción (Figura 5.34.), corrigiendo las intensidades como ya se explicó anteriormente, se observa una drástica reducción en la velocidad de producción de nanopartículas con la

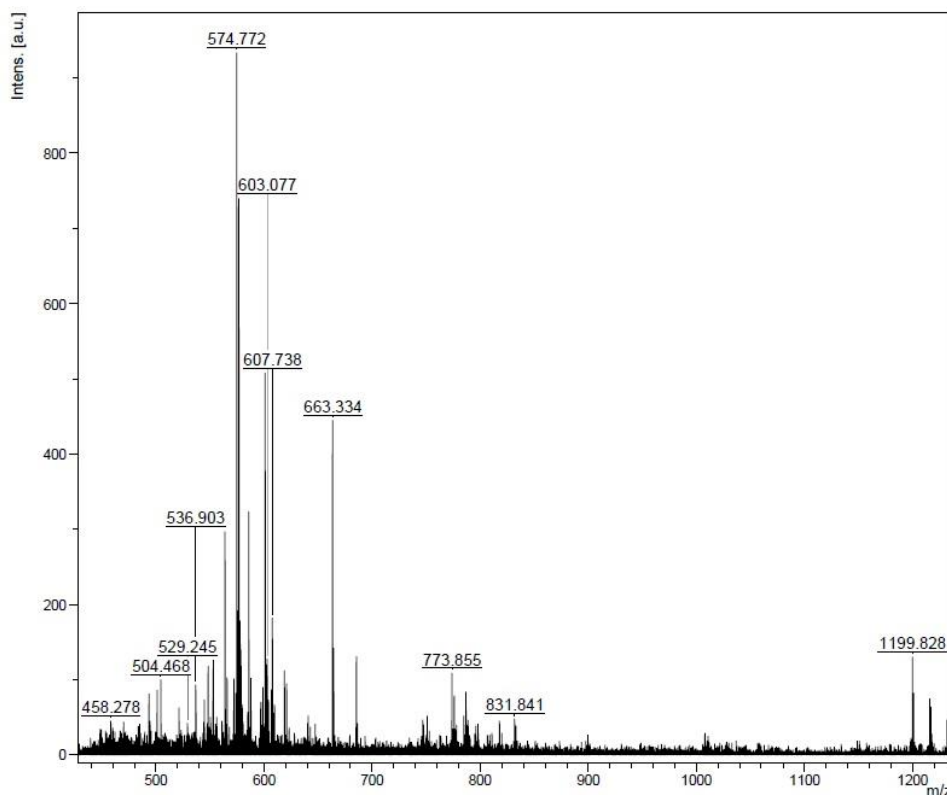
presencia de ATP en el centro de reacción. Esto podría explicarse por la presencia de la molécula en el entorno del centro activo, que, aun haciendo más favorable energéticamente la reacción, puede entorpecer la producción de partículas. Al paso de dos horas, la cantidad de partículas se duplica en el caso del control (sin ATP).



**Figura 5.34. Efecto de la adición de ATP en la producción de nanopartículas de polifruktosa.**

Finalmente, se estudió el efecto de la molécula de ATP en el peso molecular del producto obtenido, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En la figura 5.35 se muestra el espectro con las diferentes señales que corresponden con distintos pesos moleculares. Si analizamos este resultado, y lo comparamos con los espectros sin adicionar ATP (Figura 5.21.); podemos ver cómo aparece un pico, de intensidad considerable (unas 200 a.u.), a 1200 Da, que antes no se

apreciaba. Esto indica que hay una fracción significativa de cadenas, que han duplicado su peso molecular medio (situado antes en el entorno de 600 Da), gracias a la presencia de un aporte extra de energía a la polimerización.



**Figura 5.35. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF tras la adición de ATP.**

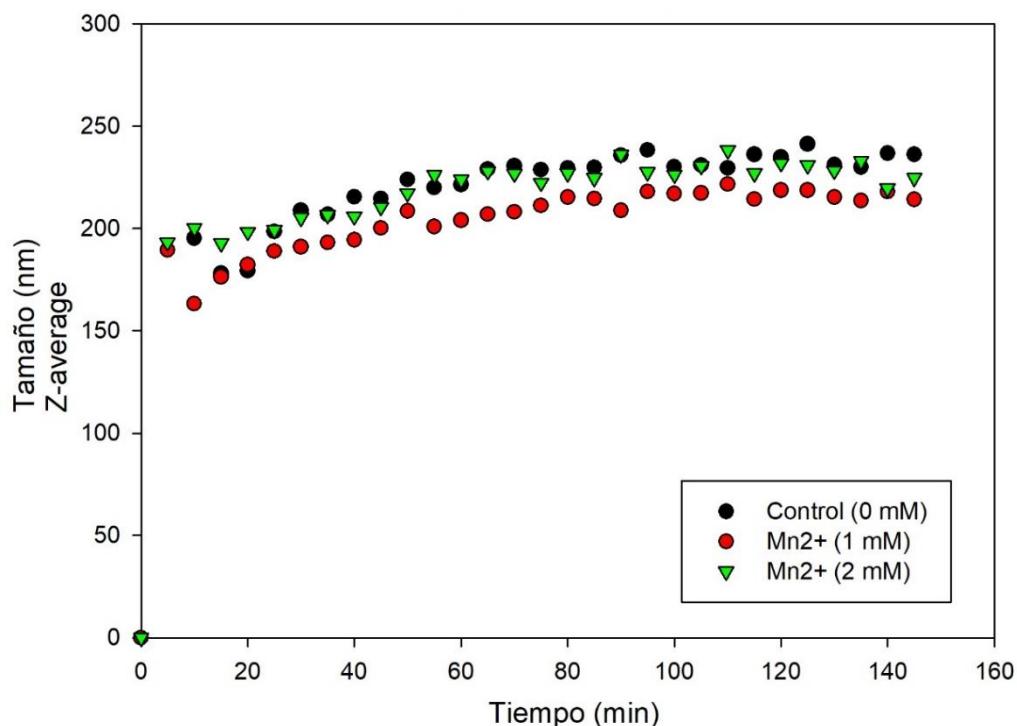
En conclusión, la adición de ATP puede suponer un aporte extra de energía al sistema, y favorecer de este modo, la polimerización de más residuos por cadena, aumentando el peso molecular, sin modificar el tamaño medio de partícula. Esto es posible dado que existe un sitio de unión a ATP en la enzima, que permite que actúe en la reacción endotérmica de transfructosilación. Sin embargo, la adición de ATP

reduce la velocidad de polimerización de la enzima, obteniendo menos cantidad de nanopartículas que sin este tratamiento.

#### **4.6. Efecto de la adición del ion manganeso ( $Mn^{2+}$ )**

De acuerdo con algunos trabajos previos, se considera que la presencia del ion manganeso ( $Mn^{2+}$ ) contribuye eficazmente a reforzar la actividad transferasa de la enzima levan-sacarasa (Szwengiel et al., 2016; Li et al., 2015). Este cambio se debe, a que el ion manganeso puede actuar como cofactor de la enzima, en su sección de transfructosilación, proporcionando más estabilidad, y contribuyendo a la extensión de las cadenas. Por tanto, cabría esperar modificaciones en el peso molecular de las cadenas de polifructosa producidas, utilizando este cofactor.

Para ello, se llevaron a cabo tres reacciones diferentes, en un reactor perfectamente mezclado, con diferentes concentraciones del ion manganeso (procedente de la sal, sulfato de manganeso,  $MnSO_4$ ), y manteniendo constante la concentración de sustrato (90 g/L de sacarosa), y de enzima (0.2 ppm). Las concentraciones ensayadas fueron 0, 1, 2 mM de  $Mn^{2+}$ , de acuerdo con las concentraciones sugeridas por Szwengiel et al. (2016). Se siguió la producción de partículas por DLS, utilizando el calibrado previamente descrito, así como la evolución del tamaño de las partículas. En la figura 5.36 se representa la evolución de los tamaños a las diferentes concentraciones de manganeso, mientras que en la figura 5.37 se observa la producción de las nanopartículas con el tiempo.

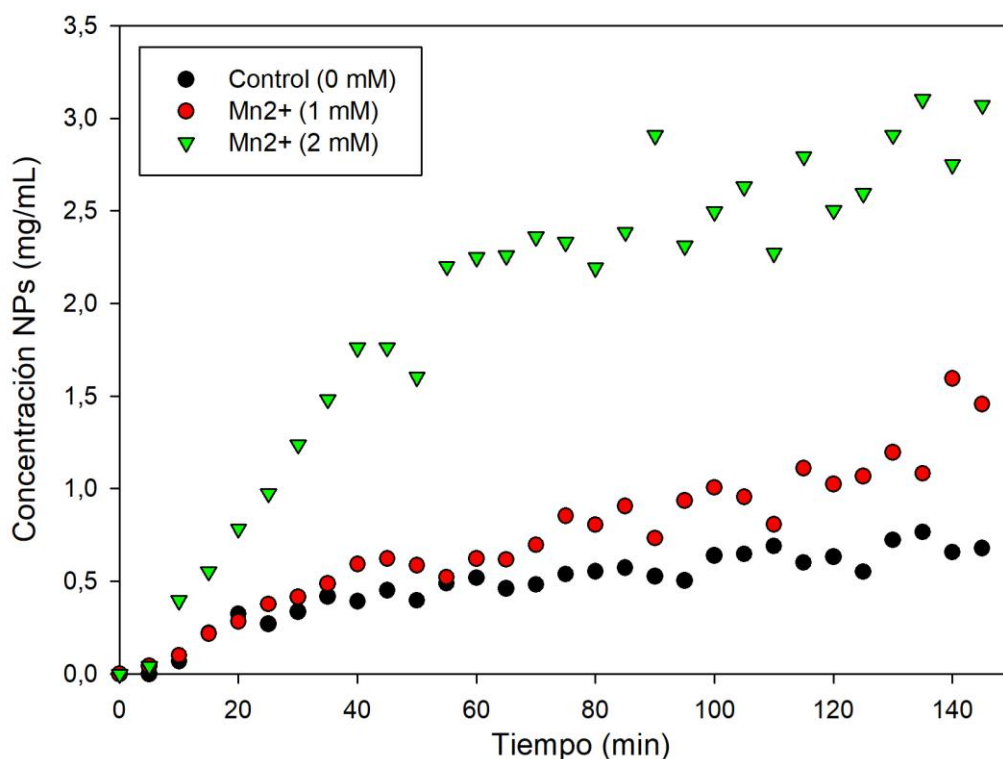


**Figura 5.36. Evolución de tamaño de partícula a distintas concentraciones de  $Mn^{2+}$ .**

Como se puede observar en las figuras 5.36 y 5.37, la adición de ion manganeso modifica la velocidad de producción de las partículas, pero no afecta al tamaño de las mismas.

Esto se comprobó de forma estadística, con el estudio mediante estadístico T si las diferencias de tamaño resultaban significativas (ver anexo I). Los resultados demostraron que no existe esa diferencia significativa para el tamaño. Sin embargo, si es destacable el incremento de producción que se obtiene con la presencia de este ion en el medio de reacción, consiguiendo duplicar la concentración de nanopartículas a las dos horas en el caso de la concentración 1 mM

(pasando de 0.6 a 1.3 mg/mL) y quintuplicar en el caso de la concentración de 2 mM (pasando de 0.6 a 3 mg/mL).



**Figura 5.37. Evolución de la producción de nanopartículas a diferentes concentraciones del ion  $Mn^{2+}$ .**

Con el objetivo de estudiar si este incremento en las primeras etapas de la reacción, se traducía en un mayor rendimiento productivo, tras 24 horas de reacción, se precipitó el polímero siguiendo el método descrito al inicio del capítulo, y se liofilizó para ser pesado finalmente, y con ello, cuantificar la conversión en cada caso.

Los resultados de conversión arrojados se muestran en la Tabla 5.1.



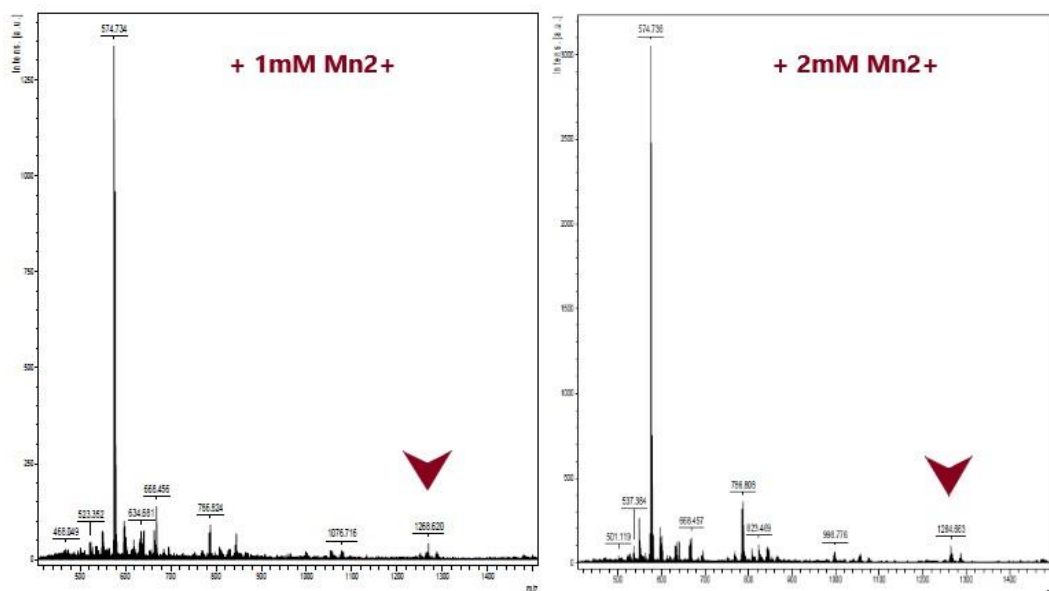
**Tabla 5.1. Rendimientos de conversión con la adición de ion  $Mn^{2+}$  a la reacción.**

Concentración de ion manganeso	% conversión (mg polifruktosa/mg sacarosa inicial)
<i>0 mM (control)</i>	17,8%
<i>1 mM</i>	21,7%
<i>2 mM</i>	38,1%

Atendiendo a estos resultados, se observa cómo la adición de 2 mM de ion manganeso duplica la cantidad de polifruktosa obtenida respecto a la sacarosa dispuesta al inicio para reaccionar. Este valor supone duplicar la producción enzimática del polímero, con la adición de una pequeña cantidad de sulfato de manganeso.

Finalmente, con el objetivo de probar que el ion manganeso incrementa la actividad transferasa de la enzima, las tres muestras fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar un posible alargamiento de las cadenas. Los resultados se muestran en la figura 5.38.

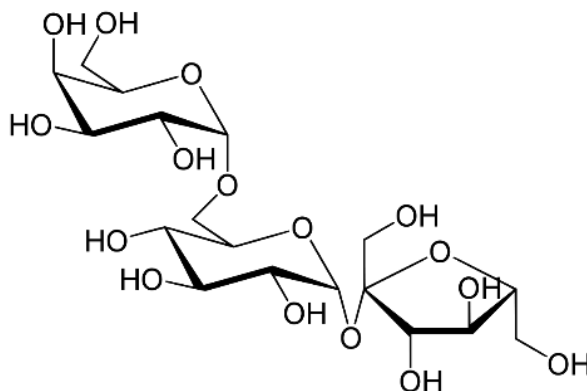
Observando los espectros de masas, se puede ver que aparece una señal de intensidad considerable a 1200 Da, lo que supone que se han conseguido cadenas de hasta 8 y 9 residuos al menos, fruto de la adición de ion manganeso. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar este oligoelemento como buena alternativa para incrementar el peso molecular de las cadenas, y como se vio anteriormente, contribuir eficazmente a la reducción del valor de CAC.



**Figura 5.38. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF tras la adición de diferentes concentraciones de ion  $Mn^{2+}$ .**

#### **4.7. Efecto de sustratos diferentes en la reacción enzimática: rafinosa**

Algunos autores habían presentado previamente al trisacárido rafinosa o melitosa (compuesto por glucosa, fructosa y galactosa) como una alternativa viable para la producción de fructooligosacáridos (Tian et al., 2012) cuya estructura química se muestra en la Figura 5.39. Como se puede observar, presenta el mismo tipo de enlace que la sacarosa entre la glucosa y la fructosa, y, por tanto, sería susceptible de ser hidrolizado para posteriormente continuar, con la producción de las polifruktosas.

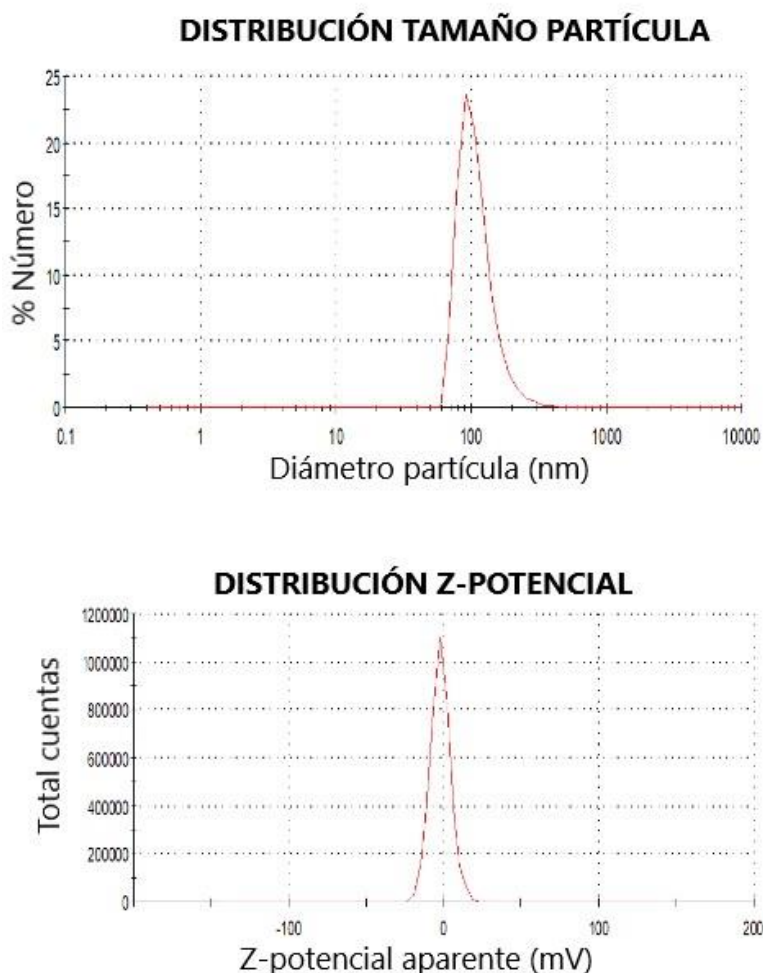


**Figura 5.39. Estructura química del trisacárido rafinosa.**

Sin embargo, los estudios anteriores se centraron principalmente en la utilización de sustrato y la obtención de polímero, sin atender a la posibilidad de producir nanopartículas también desde ese sustrato.

Por esta razón, a lo largo de esta sección, se van a presentar los resultados de algunas caracterizaciones realizadas con nanopartículas producidas desde rafinosa (sin sacarosa en el medio de reacción); junto con la cinética de generación de nanopartículas.

Lo primero a comprobar sería la existencia de nanopartículas obtenidas desde este sustrato. En la figura 5.40 se presentan la distribución de tamaño de partícula (en la parte superior) y la distribución de zeta-potencial o carga superficial (en la parte inferior). Los métodos empleados para la obtención de estas curvas están basados en la medida de DLS como ya se ha detallado previamente, para otros experimentos ya presentados.

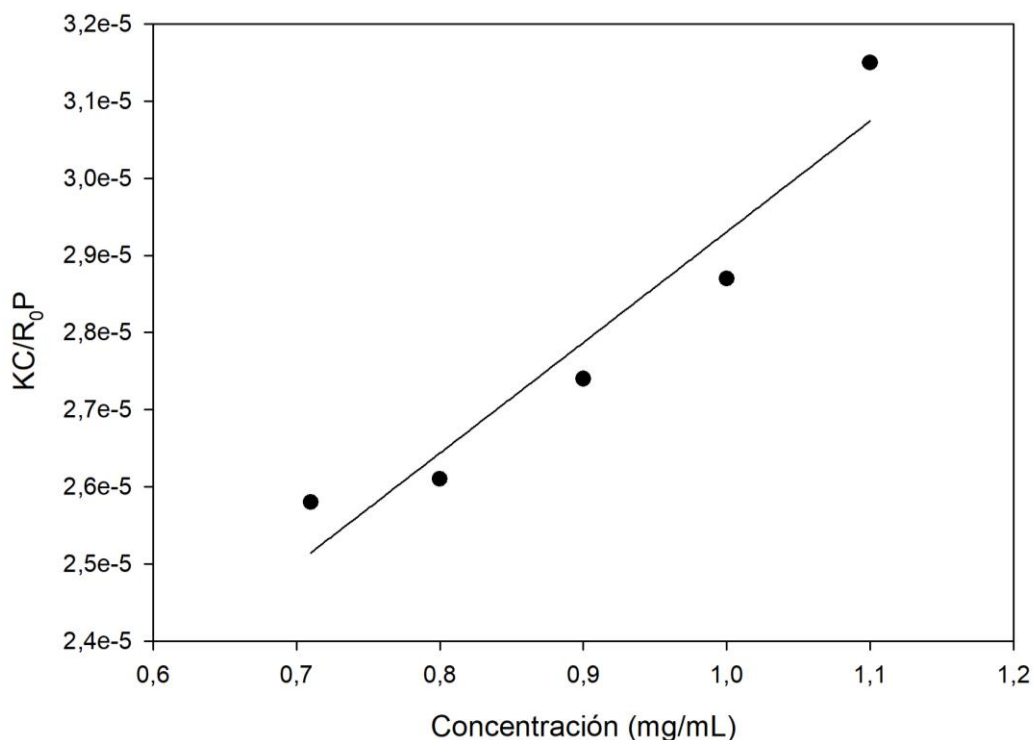


**Figura 5.40. Caracterización de nanopartículas obtenidas desde rafinosa: distribución de tamaño de partícula y de carga superficial (Z-potencial).**

Observando la figura 5.40 y comparando con las distribuciones obtenidas para las nanopartículas usando sacarosa como sustrato; se observa cómo no hay diferencias significativas ni en tamaño medio (medido en número) ni en carga superficial. El tamaño se sigue situando en el entorno de 100 nm (unos 200 nm medidos en Z-average), con un valor de índice de polidispersión (PDI) inferior a 0.1; lo que

asegura la monodispersión de las partículas producidas. El potencial Z sigue estando muy próximo a cero, ligeramente negativo (-2 mV).

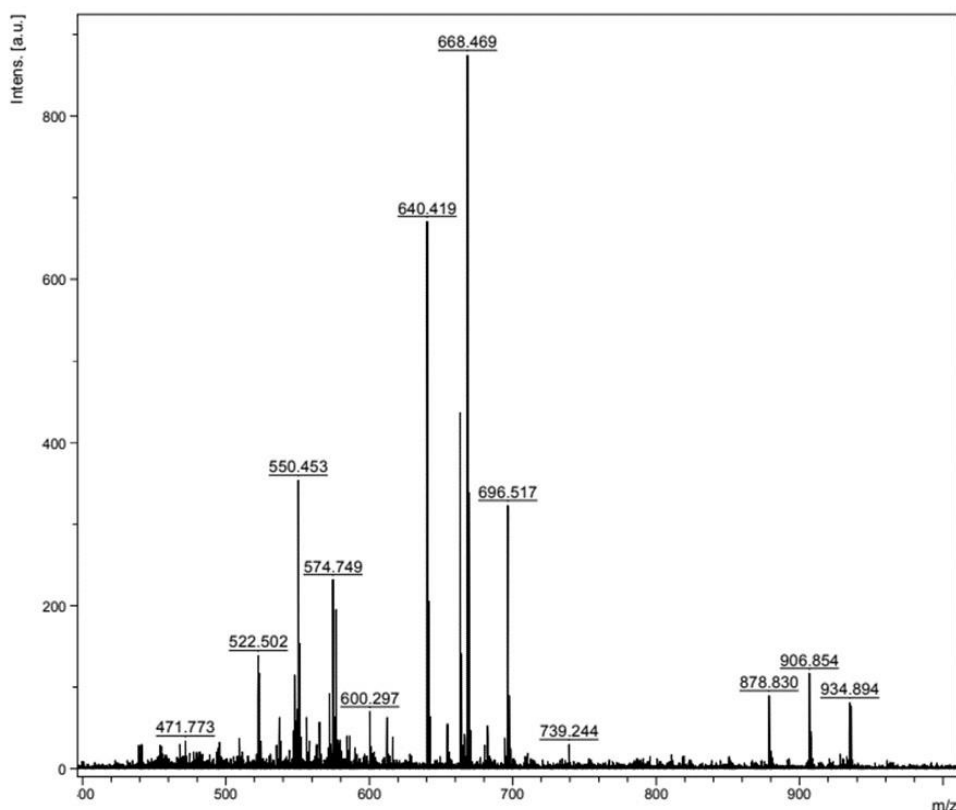
Para el estudio de la estabilidad, se determinó por SLS el valor del segundo coeficiente del virial para las partículas con rafinosa, de la pendiente de la recta que rige la ecuación de Raleigh, cuyos datos experimentales empleados para calcularla se muestran en la figura 5.41.



**Figura 5.41. Representación del gráfico de Debye para la determinación del segundo coeficiente del virial de polifruktosa obtenida desde rafinosa.**

El valor calculado de la pendiente para este caso es de  $5.49 \cdot 10^{-6}$  mL·mol·g<sup>-2</sup>, que es prácticamente el mismo (ligeramente inferior), al calculado para las partículas de sacarosa ( $6.07 \cdot 10^{-6}$  mL·mol·g<sup>-2</sup>). Finalmente, se determinó el peso molecular de las cadenas producidas

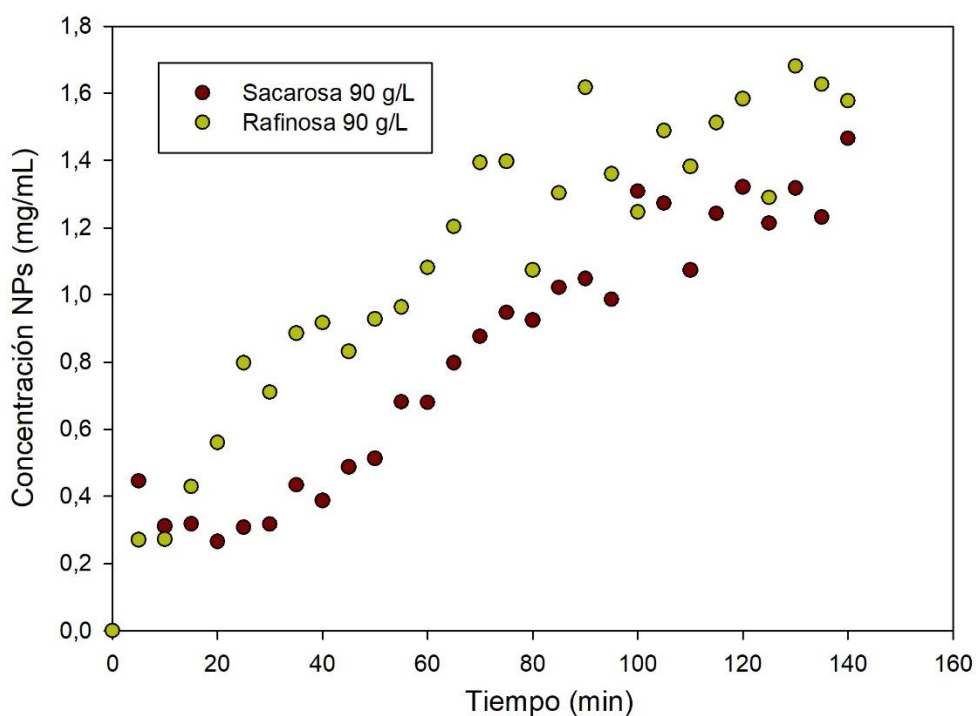
por espectrometría de masas MALDI-TOF, donde el espectro obtenido se muestra en la figura 5.42. Aquí se observa cómo la cadena de polifruktosa es, en general, un poco más larga que en el caso de la sacarosa, alcanzando los 670 Da. Sin embargo, no es suficiente para reducir considerablemente el valor de CAC, que es el parámetro clave que actúa como cuello de botella para la aplicación sistémica de estas partículas. Si se compara con otras estrategias (adición de ion manganeso o de ATP), esta estrategia resulta descartable, consiguiéndose mejores resultados en cuanto a peso molecular en las anteriores.



**Figura 5.42.** Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF para moléculas de polifruktosas producidas desde rafinosa.

Una vez caracterizadas las partículas, y considerando a la rafinosa como una alternativa a la sacarosa como sustrato, se profundizó en el conocimiento de la síntesis de nanopartículas utilizando este sustrato.

En la figura 5.43 se muestra la evolución de la concentración de nanopartículas con el tiempo, utilizando 90 g/L de sacarosa y 90 g/L de rafinosa.

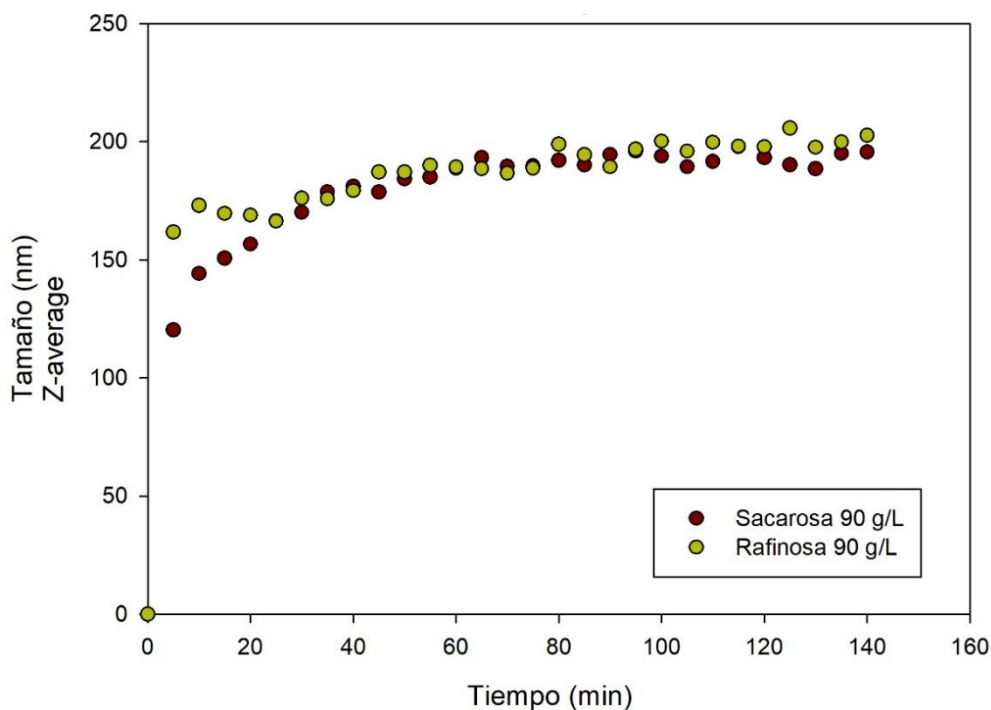


**Figura 5.43. Evolución de la concentración de nanopartículas de polifruktosa según el sustrato empleado (sacarosa y rafinosa).**

Se puede apreciar que la velocidad inicial para la rafinosa es mayor que para la sacarosa. Se puede explicar esta diferencia debido a la mayor energía liberada, por la posibilidad de una segunda hidrólisis (el trisacárido tiene dos enlaces susceptibles de ser hidrolizados). Si las concentraciones de nanopartículas iniciales se ajustan a una cinética de

primer orden (simplificación de la ecuación de Michaelis-Menten para altos valores de  $K_M$ ), los valores que obtienen son  $0.858 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para la rafinosa y  $0.488 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para la sacarosa (aumento aproximado del 75%). Sin embargo, al pasar dos horas de reacción, los resultados son semejantes con ambos sustratos, debido a que la glucosa empieza a tomar importancia como inhibidor. Estos resultados sugieren que la rafinosa puede ser un buen sustrato para intensificar la producción de polifruktosas porque ofrece mejores velocidades de producción que la sacarosa en los primeros momentos de la reacción. Sin embargo, el elevado coste de este sustrato reduce su potencial aplicación.

Finalmente, en la figura 5.44 se muestra la evolución de los tamaños medios de las nanopartículas con el tiempo.



**Figura 5.44.** Evolución del tamaño de partícula según el sustrato (sacarosa y rafinosa).



Se puede apreciar que no existen variaciones significativas en el tamaño independientemente del sustrato empleado. Este resultado está en concordancia con las distribuciones de tamaño de partícula que se presentaron previamente en la figura 5.40; donde no se observaban diferencias notables entre las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas con sacarosa o con rafinosa como sustrato para la polimerización.

## 5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON EL PRODUCTO COMERCIAL Y CON LA OBTENCIÓN MICROBIANA

Para poder concluir la caracterización de los productos obtenidos por una y otra vía, se compró el producto comercial, vendido como levan procedente de *Erwinia herbicola*, por Sigma-Aldrich; con un grado de pureza declarado del 99%. El objetivo de las caracterizaciones realizadas al material era analizar sus principales semejanzas o diferencias con levan (o polifruktosa) obtenidas en los capítulos 4 y 5 (origen microbiano y origen enzimático). En la Tabla 5.2 se comparan los principales parámetros obtenidos para los tres tipos de moléculas. Los resultados de la caracterización del producto comercial se presentan en el Anexo III.

El polímero obtenido comercialmente (desde *E. herbicola*) es capaz de reorganizarse formando nanopartículas con un tamaño semejante a las obtenidas desde la bacteria *A. nectaris*. Por otro lado, presenta un valor de Zeta potencial ligeramente superior, que puede incrementar la estabilidad de las nanopartículas; mientras que el valor del segundo coeficiente del virial se sitúa en el mismo rango que el obtenido de forma enzimática.

Lo más destacable de la tabla 5.2, es el resultado relativo al peso molecular del polímero, donde se observa el mismo comportamiento que en los casos anteriores. No se puede hablar de pesos moleculares de más de mil kDa, sino que las cadenas de polifruktosa se mueven en el entorno de 1 kDa. Sin embargo, la hoja de especificación del producto indica un peso molecular de 2000 kDa, que se presupone ha sido

obtenido por SEC-GPC. El resultado también es semejante en cuanto a la adsorción inespecífica de proteínas.

**Tabla 5.2. Comparación entre los polímeros de tres fuentes diferentes**

	<b>Comercial</b> <b>(desde</b> <b><i>E. herbicola</i>)</b>	<b>Bacteriano</b> <b>(desde</b> <b><i>A. nectaris</i>)</b>	<b>Enzimático</b> <b>(desde</b> <b>sacarosa)</b>
<b>Z-average (nm)</b>	256.9	244.8	167.6
<b>Tamaño - en</b> <b>número (nm)</b>	175.5	184.8	130.7
<b>Zeta potencial</b> <b>(mV)</b>	-7.62	-4.74	-4.35
<b>2º coeficiente del</b> <b>virial (mol·mL·g<sup>-2</sup>)</b>	$7.35 \cdot 10^{-6}$	$1.69 \cdot 10^{-5}$	$6.07 \cdot 10^{-6}$
<b>Peso molecular</b> <b>medido por</b> <b>MALDI-TOF</b> <b>(Da)</b>	≈526	≈1044	≈590
<b>Adsorción</b> <b>inespecífica de</b> <b>proteínas (%)</b>	15%	12%	< 1%

## 6. CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se ha estudiado la reacción de producción de leván por vía enzimática y se ha caracterizado el producto obtenido.

Se ha demostrado que las nanopartículas obtenidas de esta forma presentan un peso molecular inferior a las obtenidas de forma microbiana (pasando de 1000 a 600 Da como norma general), que se traduce en un incremento en el valor de la concentración de agregación crítica de las partículas (llegando a triplicarse). Las técnicas de caracterización (FT-IR, H-RMN o TGA) no encontraron diferencias significativas entre estas moléculas y las obtenidas de la fermentación microbiana.

Se ha probado que la sacarosa ejerce un efecto inhibitorio en la síntesis de partículas, posiblemente mediado por la glucosa liberada por la hidrólisis, y cómo la concentración inicial de sacarosa afecta al diámetro medio de las partículas producidas. De igual forma, se estudió el efecto de otros azúcares en la producción de nanopartículas y en su tamaño.

Se estudió de igual modo el efecto de la temperatura y la proporción enzima-sustrato. Se determinó el rango de 35-40°C como temperatura óptima de reacción, y se observó que ocurre degradación de las partículas cuando se superan los 60°C. El incremento de la proporción enzima-sustrato resultó una estrategia prometedora para incrementar el peso molecular medio de las cadenas.

Además de lo anteriormente descrito, se estudió el efecto de dos moléculas en la síntesis y tamaño de las partículas (ATP e ion manganeso). El ion manganeso contribuye a acelerar la velocidad de producción (catálisis enzimática); y con la molécula de ATP se observa la aparición de cadenas de mayores pesos moleculares.

Finalmente, se estudió la posibilidad de utilizar otro sustrato, un trisacárido (rafinosa) como fuente alternativa para la producción de estas nanopartículas utilizando la misma enzima. Los resultados obtenidos mostraron que la velocidad de producción se reduce debido a la presencia de más residuos de monosacáridos en el medio; y que no existe una variación en el tamaño de partícula. Por otra parte, sí se aprecia un ligero aumento en el peso molecular de las cadenas, pero no es suficiente para reducir el valor de CAC hasta los valores obtenidos con las moléculas de origen microbiano.

Para terminar, se presentó la comparación de las moléculas obtenidas (de forma microbiana y de forma enzimática) con la polifrutosa obtenida de forma comercial, desde el microorganismo *E. herbicola*. Los resultados obtenidos muestran que la polifrutosa de venta comercial es más semejante a la producida de forma microbiana.

---

**Artículo publicado relacionado con el capítulo:** Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: microbial vs. cell-free systems. International Journal of Biological Macromolecules 137 (2019), 62-68.



# **Capítulo 6**

---

**Estudio de la formación de  
nanopartículas de levan:  
Modelado de cinéticas y auto-  
ensamblado**





## **1. INTRODUCCIÓN**

Durante los capítulos previos se ha visto cómo la producción de nanopartículas puede llevarse a cabo de forma enzimática o de forma microbiana. El estudio de la cinética microbiana fue llevado a cabo en el capítulo 4, donde se determinaron los principales coeficientes estequiométricos así como los principales parámetros de las ecuaciones cinéticas. Sin embargo, debido a que la producción enzimática es más novedosa, es necesario realizar un modelo que permita predecir el comportamiento de la enzima cuando se encuentra aislada de un sistema vivo.

Específicamente, se busca estudiar la cinética enzimática cuando la enzima trabaja en un sistema libre de células (*cell-free system*), analizando cómo influye el sustrato en la cinética enzimática, utilizando los datos aportados en el capítulo anterior, donde se analizaba la producción de polímero según la concentración de sacarosa inicial. Por otro lado, se busca analizar cómo ocurre el fenómeno de auto-ensamblado, cómo influye el parámetro de la CAC (Concentración de Agregación Crítica), y la velocidad con la que ocurre dicho proceso. Se presentarán las ecuaciones correspondientes al modelo, y se determinarán los parámetros involucrados, mediante una Estimación Hessiana (función de la máxima probabilidad).

La necesidad de este estudio surge debido a la escasa presencia de literatura relacionada con el proceso de auto-ensamblado de las nanopartículas de levan. Se han publicado muchos estudios experimentales que analizan la producción de este polímero,

centrándose exclusivamente en eso, sin prestar atención a la influencia en el ensamblado de partículas. Además, ningún estudio ha explorado la vía de un modelo matemático, ni para explicar el mecanismo catalítico completo, ni para explicar el proceso de auto-ensamblado. Solamente hay algunos estudios parecidos en la bibliografía, relacionados con el ensamblado de inulina (Barclay et al., 2016), o con el de co-polímeros de bloque (Jeong et al., 1999). Sin embargo, no hay literatura científica que genere un modelo integral, que combine ambos modelos.

## **2. EXPERIMENTACIÓN PREVIA A LA FORMULACIÓN DEL MODELO**

Para la correcta formulación del modelo de reacción es necesaria la realización de experimentación que permita predecir los parámetros, y ajustar las ecuaciones formuladas al comportamiento empírico observado. Los experimentos a utilizar son los presentados en el capítulo 5 relacionados con la concentración de nanopartículas en función del tiempo y de la concentración de sacarosa inicialmente utilizada. Por otro lado, es necesario realizar dos experimentos adicionales para una correcta formulación del modelo, que son:

- 1) comprobar la existencia de envenenamiento del catalizador
- 2) estudiar la desagregación de las partículas

### **2.1. Validación de la teoría de envenenamiento**

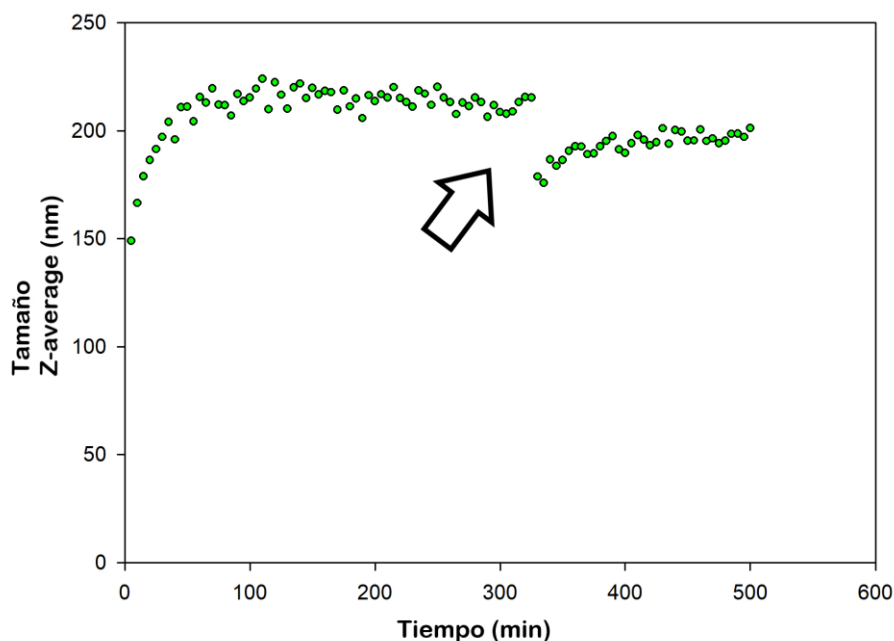
El fenómeno de envenenamiento de catalizador está presente en algunas enzimas como un control alostérico de la reacción (Bisswanger, 2017), donde el producto reduce la cantidad de enzima disponible para la catálisis, reduciendo, por tanto, la velocidad global de reacción.

Con el objetivo de comprobar la existencia o no de este fenómeno, se llevó a cabo una reacción enzimática de hidrólisis y transfructosilación (producción de levan), que fue monitorizada,

mediante DLS, estudiando el tamaño de las nanopartículas, así como su concentración (calculada desde la intensidad).

La concentración inicial de sacarosa utilizada fue 90 g/L y la concentración de enzima fue 0.2 ppm. Cuando se observa que la catálisis ha alcanzado la fase estacionaria, es decir, la velocidad de conversión se ha visto muy reducida (a los 330 minutos), se añade nueva enzima en el medio. Específicamente, se añade enzima hasta duplicar la concentración de la misma en el medio, pasando de 0.2 ppm a 0.4 ppm. Tras la adición, se continúa monitorizando el proceso mediante DLS, analizando tanto tamaño como producción. Los resultados se muestran en las figuras 6.1 y 6.2, para el tamaño y la concentración de nanopartículas respectivamente.

La figura 6.1 representa la evolución del tamaño de partícula durante el experimento, donde se observa que existe una interrupción importante, que se corresponde con la adición de nueva enzima (a los 330 minutos), donde señala la flecha. La presencia de nueva enzima implica que comienza la síntesis de nuevas cadenas, y, por tanto, un nuevo fenómeno de crecimiento del diámetro de partícula (semejante al que se observa en los primeros momentos de la reacción enzimática).

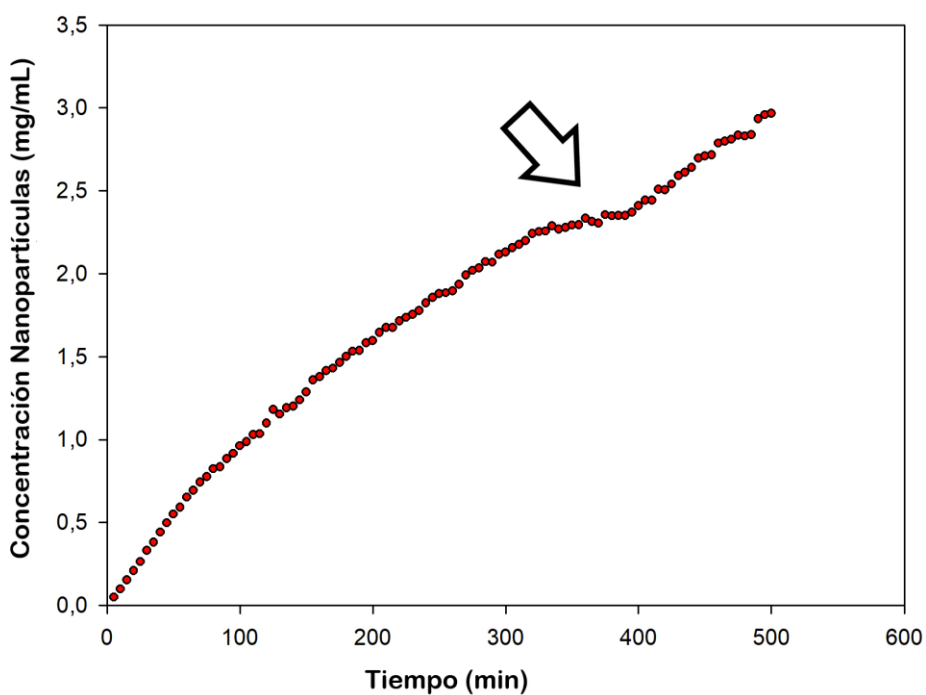


**Figura 6.1. Evolución del tamaño de partícula en la síntesis de polímero. Efecto de la adición de enzima extra (ocurre en el momento que señala la flecha).**

Esta hipótesis del envenenamiento enzimático, se ve confirmada por los valores de intensidad obtenidos mediante DLS, que son proporcionales a la concentración de nanopartículas en el medio (Figura 6.2).

Así, cuando se añade la nueva enzima, la velocidad de catálisis vuelve a aumentar considerablemente, indicando que no es escasez de sustrato, sino envenenamiento de la enzima lo que ha ocurrido, volviéndose a obtener semejantes valores de velocidad a los que se presentan en las primeras etapas de la reacción enzimática.

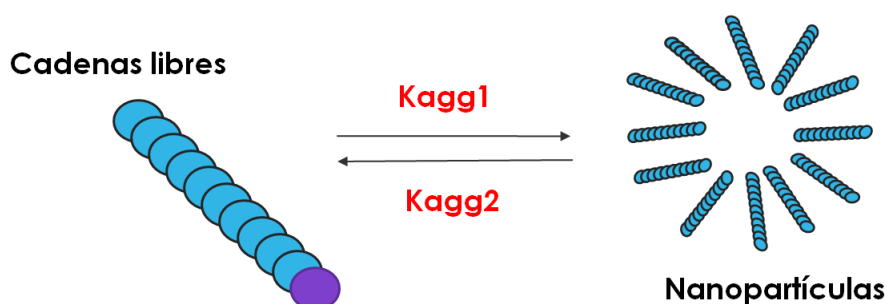
Con estos resultados, se puede incluir el parámetro de envenenamiento en el modelo, que estará relacionado con la concentración de polímero presente, dado que, a mayor cantidad de polímero, mayores enzimas afectadas por el impedimento estérico para la catálisis.



**Figura 6.2. Evolución de la concentración de nanopartículas. Efecto de la adición de enzima nueva (ocurre en el momento que señala la flecha).**

## **2.2. Estudio de la cinética de desagregación de las partículas**

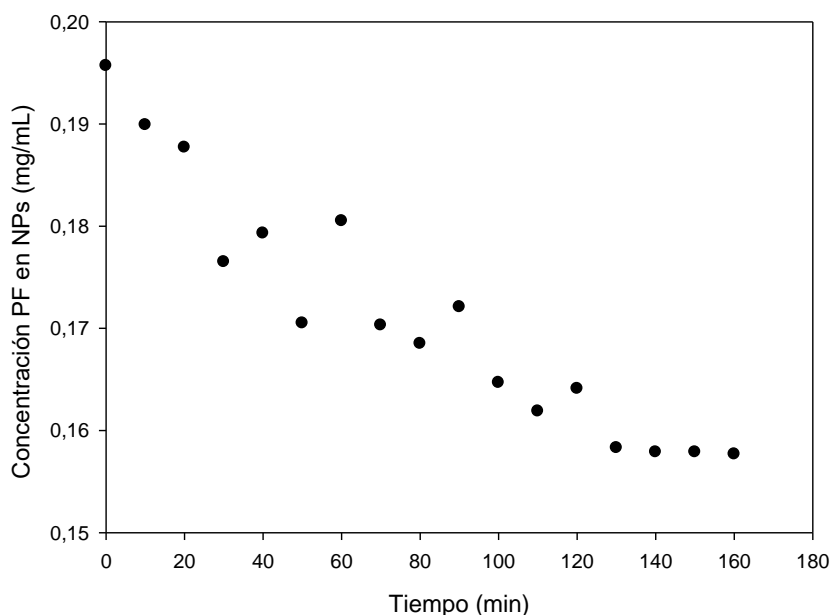
Como se ha comentado anteriormente, la formación de las nano-estructuras por auto-ensamblado es un equilibrio que viene marcado por la concentración de polímero presente en la muestra. De esta forma, ocurren de forma paralela, y en sentido opuesto, un fenómeno de agregación y uno de desagregación como se muestra en la figura 6.3.



**Figura 6.3. Esquema del equilibrio de agregación-desagregación en la obtención de nanopartículas a partir de cadenas libres de polifrufructosa.**

Durante los estudios presentados en el capítulo 5 se ha observado cómo ocurre la síntesis y agregación de las partículas, pero no se ha estudiado la cinética de desagregación de las mismas. Para ello, se preparó una disolución a concentración 1 mg/mL, que fue agitada y mantenida para que se produjese el auto-ensamblado, con la consiguiente formación de las nano-partículas. Tras esto, la muestra fue diluida 5 veces hasta alcanzar la concentración de 0.2 mg/mL, a partir de la cual, según los estudios realizados con pireno, comienza la desagregación de las nano-estructuras. Esta disolución se monitorizó mediante DLS, estudiando el tamaño de partícula y la intensidad de luz

dispersada, que es proporcional a la concentración de nanopartículas. Una vez corregidos los valores de intensidad con el tamaño, y el calibrado descrito anteriormente, se representaron los valores de la concentración de nanopartículas con respecto al tiempo (Figura 6.4.)



**Figura 6.4. Cinética de desagregación de las nanopartículas de levan.**

En la figura 6.4 se puede observar que la desagregación sigue una cinética de orden uno, dependiendo de una constante, que será llamada posteriormente, constante de desagregación ( $K_{agg2}$ ), en el planteamiento del modelo. Con los datos experimentales se pudo determinar dicha constante, que toma el valor de  $2.3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Este valor será usado en la formulación del modelo.



### **3. FORMULACIÓN DEL MODELO**

La velocidad de producción de las nanopartículas tiene dos contribuciones importantes, por un lado, la velocidad en la producción del polímero, y, por otro lado, el proceso de auto-ensamblado, que como se ha comentado en capítulos anteriores, forma parte de un equilibrio termodinámico, que depende del parámetro conocido como Concentración de Agregación Crítica (CAC), y que tiene un efecto importante sobre la distribución del tamaño de partícula.

El modelo planteado realiza las siguientes suposiciones, basadas en la observación experimental:

- a) La concentración de enzima no es constante en el tiempo. Se produce un envenenamiento enzimático, como ya se ha mencionado antes, debido al ensamblado del polímero durante la síntesis (la cadena se sitúa cerca del sitio activo, reduciendo la efectividad catalítica).
- b) El sistema se encuentra bien mezclado en el reactor, donde no se consideran fenómenos de transporte o limitaciones difusionales.

Asumiendo estas consideraciones iniciales, se puede expresar la concentración de enzima útil para la catálisis como una función de la cantidad de polifrutosa producida. A mayor concentración de polifrutosa, mayores impedimentos estéricos, y por tanto, menor enzima disponible para la reacción. De forma matemática, se expresa en la ecuación 6.1, donde el parámetro  $\omega$ , conocido como factor de

envenenamiento expresa la relación másica de enzima que se inhibe por unidad de masa de polifrutosa.

$$C_{enz} = C_{enz(t=0)} - \omega \cdot C_{PF} \quad (\text{Ec. 6.1.})$$

La producción de polifrutosa lleva asociada dos diferentes reacciones como ya se ha explicado previamente. Por un lado, la hidrólisis de la sacarosa, y por otro lado, la polimerización de las fructosas. Dos reacciones, que como ya se ha comentado, se encuentran espaciadas espacial y temporalmente, y, por tanto, dos cinéticas acopladas que se deben modelar. A nivel global, algunos autores (Strube et al., 2011) ya han sugerido que la cinética de Michaelis-Menten es la responsable de explicar la reacción en su conjunto. Por esta razón, se utilizará esta cinética para modelar cada una de las dos contribuciones.

De esta forma, la ecuación para la velocidad de la hidrólisis de la sacarosa queda definida en la ecuación 6.2.

$$\frac{dC_{sac}}{dt} = \frac{K_{cat(H)} \cdot C_{enz} \cdot C_{sac}}{K_{M(H)} + C_{sac}} \quad (\text{Ec.6.2.})$$

Como se ha descrito anteriormente, la hidrólisis de la sacarosa produce glucosa y fructosa, y por estequiometría, se conoce que cada molécula de sacarosa genera una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, que en forma de concentración másica (mg/mL), supone la mitad (el peso molecular de la glucosa y la fructosa es la mitad que el

de sacarosa). De esta forma, se puede calcular la producción de ambos azúcares atendiendo a las ecuaciones 6.3 y 6.4.

$$\frac{dC_{Glu}}{dt} = 0.5 \cdot \frac{K_{cat(H)} \cdot C_{enz} \cdot C_{Sac}}{K_{M(H)} + C_{Sac}} \quad (\text{Ec.6.3.})$$

$$\frac{dC_{Fru}}{dt} = 0.5 \cdot \frac{K_{cat(H)} \cdot C_{enz} \cdot C_{Sac}}{K_{M(H)} + C_{Sac}} - \frac{K_{cat(P)} \cdot C_{enz} \cdot C_{Fru}}{K_{M(H)} + C_{Fru}} \quad (\text{Ec.6.4.})$$

La cantidad de fructosa libre que se determina con la ecuación 6.4, es el balance entre la generada por la hidrólisis, y la consumida al ser polimerizada para formar polifrufructosa. La concentración de la polifrufructosa libre, es el balance entre la polifrufructosa que se ha producido por polimerización y la que se está perdiendo porque forma nano estructuras debido al auto-ensamblado. La evolución de la concentración de polifrufructosa libre con respecto al tiempo se muestra en la ecuación 6.5.

$$\frac{dC_{PF(libre)}}{dt} = \frac{K_{cat(P)} \cdot C_{enz} \cdot C_{Fru}}{K_{M(P)} + C_{Fru}} - K_{agg1} \cdot C_{PF(libre)} + K_{agg2} \cdot C_{PF(part)} \quad (\text{Ec.6.5.})$$

En la ecuación 6.5, se muestran dos constantes de agregación, que son en realidad, las constantes de agregación (1) y de desagregación (2), dado que estamos ante un proceso físico reversible, que va controlado exclusivamente por la concentración de la polifrufructosa en el medio. Sin embargo, las velocidades de agregación y desagregación no son semejantes. En ambos casos, tienen unidades de

tiempo a la inversa ( $s^{-1}$ ) y son una medida de la velocidad con la que se agregan o desagregan las cadenas del polímero.

En general, se asume que la constante de desagregación no varía, y que la constante de agregación depende de varios parámetros como el coeficiente de difusión o el tamaño de la partícula. La constante de agregación ( $K_{agg1}$ ) cambiará con el tiempo debido a que se considera que sigue un modelo de agregación limitado por la difusión (DLCA, por sus siglas en inglés, *Diffusion Limited Cluster Aggregation*), cuya expresión se muestra en la ecuación 6.6. (Witten y Sander, 1981).

$$F = (4\pi r_p^2) \cdot 2D_{part} \frac{dN_{NPs}}{dr_p} \quad (\text{Ec.6.6.})$$

Donde F representa la velocidad de agregación de las partículas, que es proporcional a la superficie de la partícula esférica ( $4\pi r_p^2$ ), el coeficiente de difusión ( $D_{part}$ ) y la variación del número de partículas con respecto a su tamaño ( $dN_{NPs}/dr_p$ ). Desde esta ecuación, se puede deducir la ecuación 6.7, para determinar la constante de agregación 1 ( $K_{agg1}$ ).

$$K_{agg1} = 0.5 \frac{D}{4\pi r_p^2} \left( \tanh \left( \frac{C_{PF(libre)} - CAC}{0.01} \right) + 1 \right) \quad (\text{Ec.6.7.})$$

La constante de agregación lleva incluida una función escalón de Heaviside, para explicar el fenómeno de auto-ensamblado controlado por la concentración de agregación crítica (CAC). La función escalón es una expresión del cambio en el balance entropía/entalpía de un sistema cuando se adquiere el valor de la concentración crítica.

#### 4. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

La estimación de parámetros del modelo descrito anteriormente, se llevó a cabo utilizando el software de *Process Systems Engineering* (PSE), gPROMS 5.0.2.

Para realizar la estimación de los parámetros, el programa utiliza una estimación hessiana, que se conoce como Estimación basada en la máxima probabilidad (*Maximum likelihood formulation*). Esta estimación puede utilizar diversos modelos de varianza. En la resolución, gPROMS trata de determinar valores para un parámetro físico desconocido y para un modelo de varianza  $\Theta$  que maximice la probabilidad ( $\Phi$ ) de que el modelo prediga los valores de los experimentos. Asumiendo que los errores se distribuyen de forma independiente, y en distribución normal, de media cero y desviación estándar  $\sigma_{ijk}$ , el objetivo de mayor probabilidad se expresa de la forma siguiente, en la ecuación 6.8.

$$\phi = \frac{N}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\Theta} \left( \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[ \ln(\sigma_{ijk}^2) + \frac{(\tilde{z}_{ijk} - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2} \right] \right) \quad (\text{Ec.6.8})$$

Dónde:  $\Phi$  es la probabilidad, N el número total de muestras tomadas durante todos los experimentos,  $\Theta$  se corresponde con el conjunto de parámetros del modelo a ser estimado, NE es el número de experimentos realizados,  $NV_i$  el número de variables medidas en cada experimento i.  $NM_{ij}$  es el número de medidas de la variable j en el experimento i;  $\sigma_{ijk}^2$  es la varianza de la k medida de la variable j en el

experimento  $i$  (viene marcado por el modelo de varianza del modelo),  $\tilde{z}_{ijk}$  es el valor medido de la variable  $j$  en el experimento  $i$  y  $z_{ijk}$  es el valor predicho de la variable  $j$  en el experimento  $i$  (Tsipa et al., 2018).

La incertidumbre de una medida es una propiedad de la misma que se asocia con el sensor. Cuando se resuelve la estimación de parámetros, todas las medidas se asocian con un sensor. Algunas variables se pueden agrupar con el mismo sensor, y cada grupo de sensores se puede asociar con un modelo de varianza. Se distinguen 4 tipos diferentes de modelos de varianza para la estimación de parámetros, que se recogen, a continuación, en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1. Modelos de varianza para estimación de parámetros junto a su correspondiente descripción matemática.**

Modelo de varianza	Descripción matemática
<i>Varianza constante</i>	$\sigma^2 = \theta^2$
<i>Varianza relativamente constante</i>	$\sigma^2 = \theta^2 \cdot (z^2 + \varepsilon)$
<i>Varianza heteroscedástica</i>	$\sigma^2 = \theta^2 \cdot (z^2 + \varepsilon)^\gamma$
<i>Varianza lineal</i>	$\sigma^2 = (\alpha \cdot z + \beta)^2 + \varepsilon$

Se puede observar en la Tabla 6.1, cómo se engloban diferentes factores, que pueden hacer más compleja la resolución del problema, pero podrían ser necesarios para el ajuste (Tsipa et al., 2018).

Para el análisis de la fiabilidad o bondad del ajuste, se utiliza el valor ponderado de los residuales (WR, weighted residuals), y se compara con el valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para un nivel de confianza del 95%. Esta estadística se conoce como MSWD (*Mean Square Weighted Deviation*), donde el parámetro chi-cuadrado se define como en la ecuación 6.9.

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - C_i)^2}{\sigma_i^2} \quad (\text{Ec. 6.9.})$$

Dónde:  $O_i$  es el valor observado en la medida  $i$ ,  $C_i$  es el valor calculado para esa medida  $i$ ,  $\sigma_i^2$  es la desviación estándar de esa medida  $i$  (de acuerdo con el modelo de varianza impuesto).

El valor ponderado de los residuales (WR) es simplemente la integral sobre el dominio del residual, multiplicado por una función de ponderación. Se asume de forma general, que el modelo predice de forma satisfactoria los resultados experimentales cuando el valor de los residuales ponderados es inferior al valor de chi-cuadrado. En el caso contrario ( $WR > \chi^2$ ), es necesario que se realicen modificaciones en las ecuaciones del modelo para describir de una forma más precisa los resultados experimentales (gPROMS User Guide, PSE, 2017).

Se utilizaron los resultados experimentales de la adición de diferentes concentraciones de sustrato para realizar la estimación. Como modelo para la varianza se seleccionó el modelo de varianza constante, y el sensor utilizado para la estimación de los parámetros se

fijó como una función de la variable: concentración de polifruktosa en las nanopartículas ( $C_{PF(part)}$ ), con un rango de 0.005 a 0.15.

Para el caso de la cinética enzimática, se estimaron 5 parámetros diferentes: el coeficiente de envenenamiento ( $\omega$ ), la constante catalítica de la hidrólisis ( $K_{cat(H)}$ ), la constante catalítica de la polimerización ( $K_{cat(P)}$ ), la constante de Michaelis-Menten de la hidrólisis ( $K_{M(H)}$ ), la constante de Michaelis-Menten de la polimerización ( $K_{M(P)}$ ). Para el caso del proceso de auto-ensamblado se estimó el valor de la concentración de agregación crítica (CAC).

Las condiciones límite de valor para los parámetros de la cinética enzimática (constantes catalíticas y constantes de Michaelis-Menten) se fijaron entre 0.005 y  $10^8$  (en sus respectivas unidades: katal y g/L) con el objetivo de otorgar suficiente flexibilidad al modelo.

Para el caso del coeficiente de envenenamiento ( $\omega$ ), los límites están fijados entre 0 y 1, debido a su definición (no se podrían tener relaciones ni negativas, ni superiores a la unidad). Para el caso de la concentración de agregación crítica, los límites se fijaron entre 0 y 0.5 mg/mL, de acuerdo con las observaciones experimentales, donde a 0.5 mg/mL se observa claramente una distribución perfecta de las partículas como coloide.



Se incluyeron en el software los resultados de tamaño de partícula y de concentración de polifruktosa en las nanopartículas para las seis concentraciones diferentes de sacarosa inicial (45, 60, 75, 90, 105 y 120 g/L).

En un primer lugar, se realizó la estimación de parámetros sin fijar ninguno de los mismos. Del resultado de esa simulación preliminar, y fruto de la convergencia de los resultados en algunos parámetros, se fijaron 4 parámetros para una segunda simulación más precisa. Concretamente, se establecieron los valores de  $K_{M(H)}$ ,  $K_{M(P)}$ ,  $\omega$  y CAC, con los siguientes valores: 309.8 (g/L), 89900 (g/L),  $9.5 \cdot 10^{-6}$  (g enzima/g polímero) y 0.13 (mg/mL).

Con estos nuevos valores, es posible ser mucho más preciso en las siguientes simulaciones, donde solamente se estimarán los valores de las constantes catalíticas ( $K_{cat(H)}$  y  $K_{cat(P)}$ ). Los resultados de los valores para cada uno de los experimentos se muestran en la Tabla 6.2.

De los parámetros obtenidos en la Tabla 6.2, se puede observar que existe una variación en los valores de las constantes catalíticas para la hidrólisis y para la polimerización, que dependen de las concentraciones iniciales de sacarosa. Se observa un incremento en la velocidad de hidrólisis hasta 332 kat (con concentración inicial de 90 g/L), seguidos de una disminución; mientras, que, en el otro caso, se produce, a concentraciones mayores, un incremento de la polimerización hasta alcanzar valores de  $1.48 \cdot 10^7$  kat. Por tanto, se

pueden identificar dos procesos de inhibición que actúan en paralelo: la inhibición por la sacarosa inicial, y la inhibición por la glucosa que se desprende de la hidrólisis.

**Tabla 6.2: Resultados obtenidos de la estimación de parámetros del modelo.**

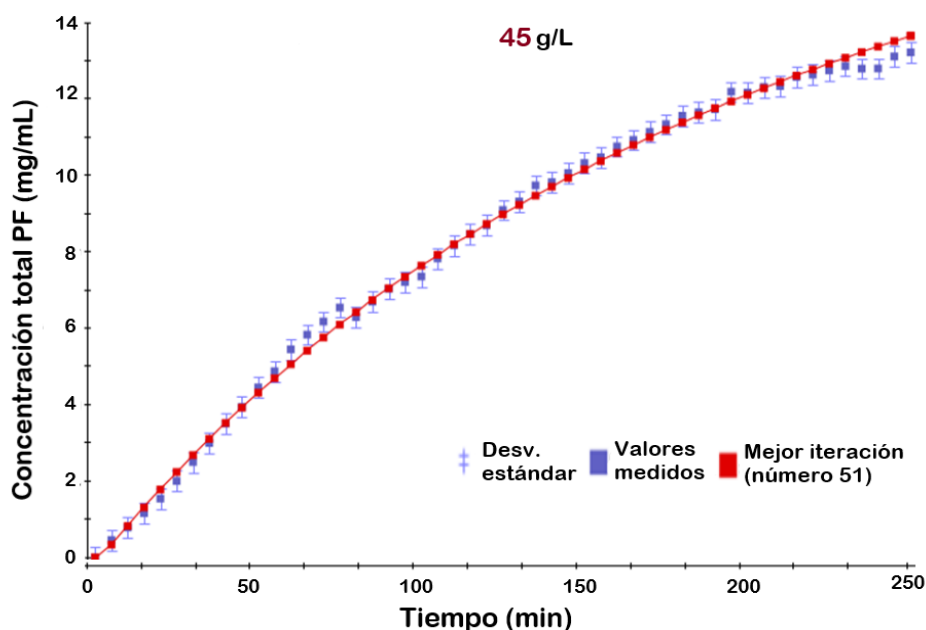
Concentración inicial de sacarosa (g/L)	KcatH (kat)	KcatP (kat)	KmH (g/L)	KmP (g/L)	$\omega$ (g enzima/ g PF)	CAC (g/L)
<b>45</b>	77.20	$3.89 \cdot 10^6$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13
<b>60</b>	251.8	$6.05 \cdot 10^4$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13
<b>75</b>	164.8	$1.27 \cdot 10^5$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13
<b>90</b>	332.0	$5.03 \cdot 10^4$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13
<b>105</b>	56.63	$3.53 \cdot 10^5$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13
<b>120</b>	35.66	$1.48 \cdot 10^7$	309.8	89,900	$9.5 \cdot 10^{-6}$	0.13

Debido al elevado valor que toma la constante de Michaelis-Menten para la polimerización, esta segunda parte de la reacción se puede estimar como una cinética de orden uno, donde la constante catalítica toma valores entre 0 y 164 kat.

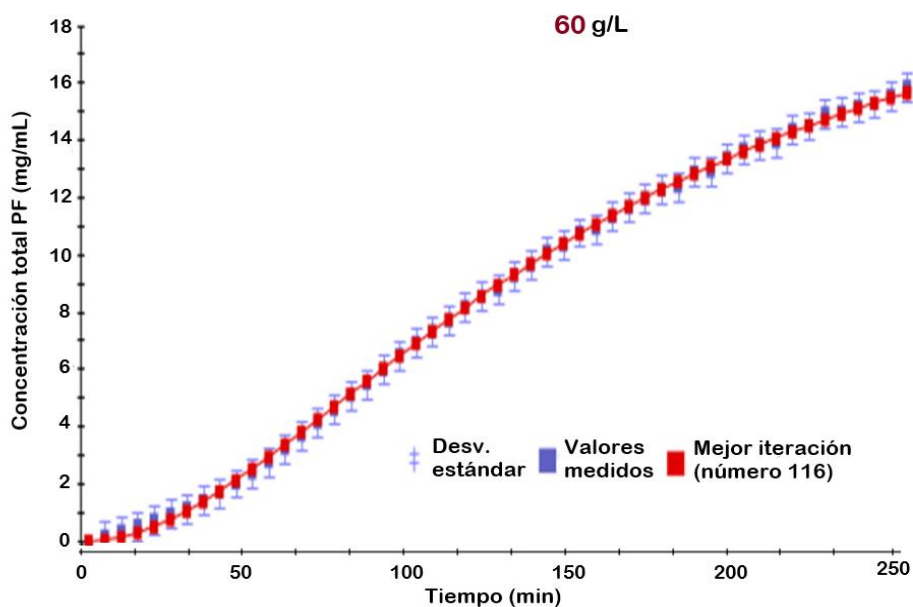
En las seis estimaciones (una para cada concentración), el valor de los residuales ponderados (WR) toma un promedio de 50.1, y el valor promedio de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) es 64.0. Por tanto, el valor de WR

es inferior a  $\chi^2$  indicando que el ajuste es apropiado, para un nivel de confianza del 95%. Como promedio, el número de iteraciones necesarias para resolver la estimación de parámetros es 106, y el tiempo empleado 23 segundos; con notables diferencias entre unos y otros, como viene mostrado en las figuras siguientes, donde se representan los ajustes obtenidos tras la estimación de parámetros.

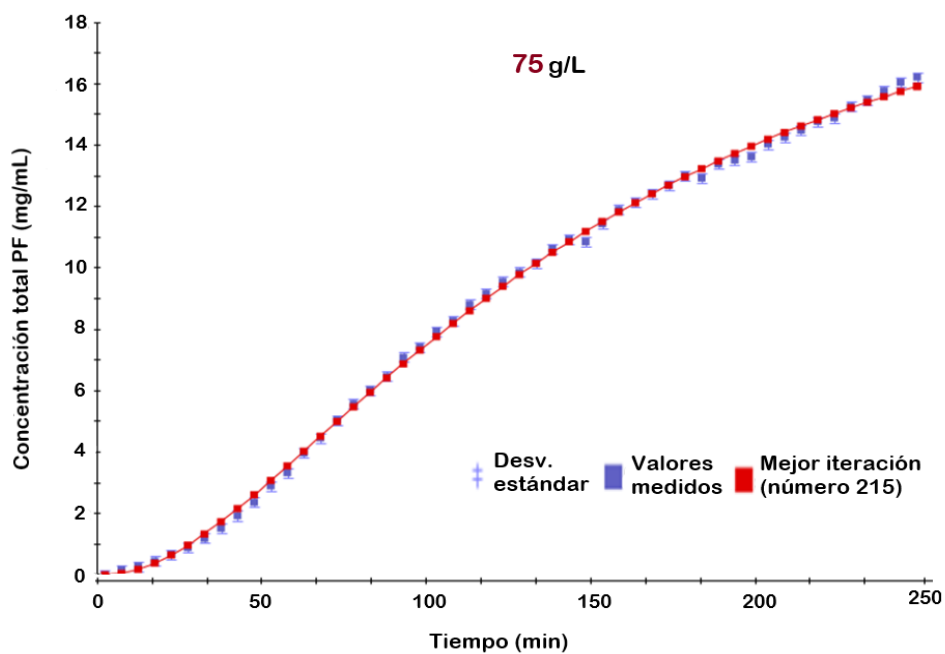
En las figuras 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 y 6.10 se muestran los valores medidos en azul (con sus respectivas desviaciones estándar) y los valores predichos por las simulaciones en rojo, para cada una de las concentraciones iniciales de sacarosa (45, 60, 75, 90, 105, 120 g/L respectivamente).



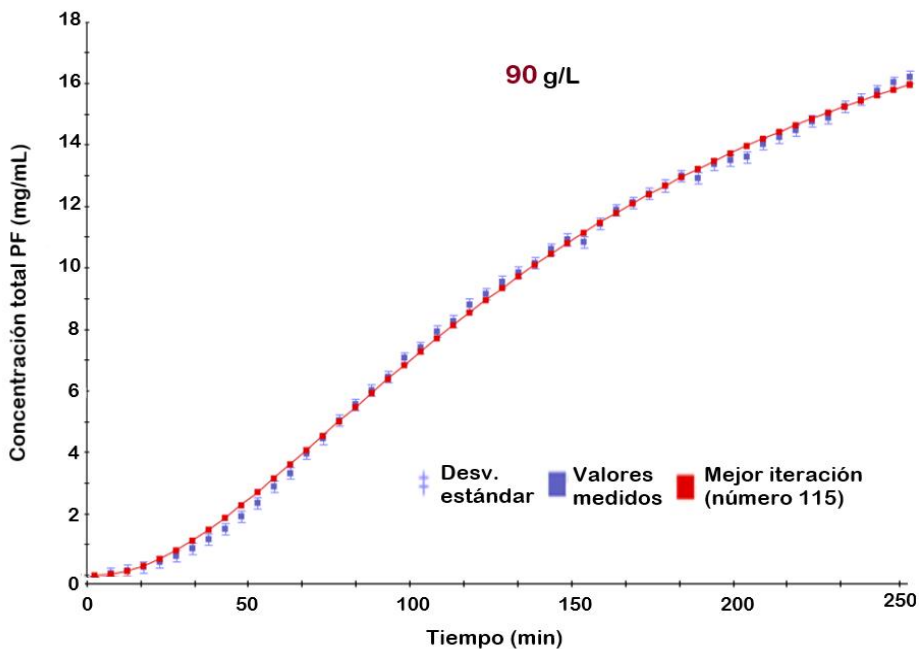
**Figura 6.5.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 45 g/L.



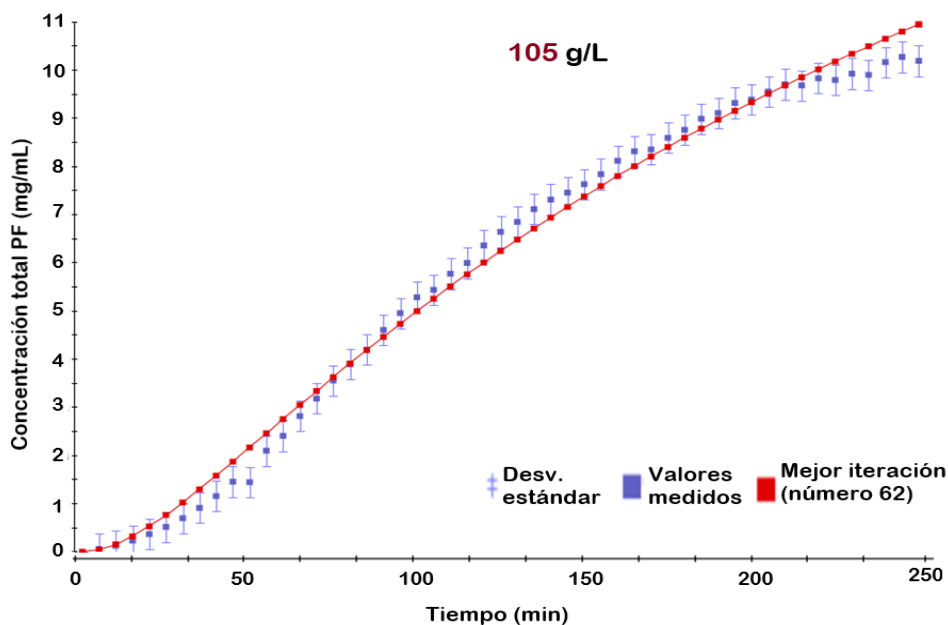
**Figura 6.6.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 60 g/L.



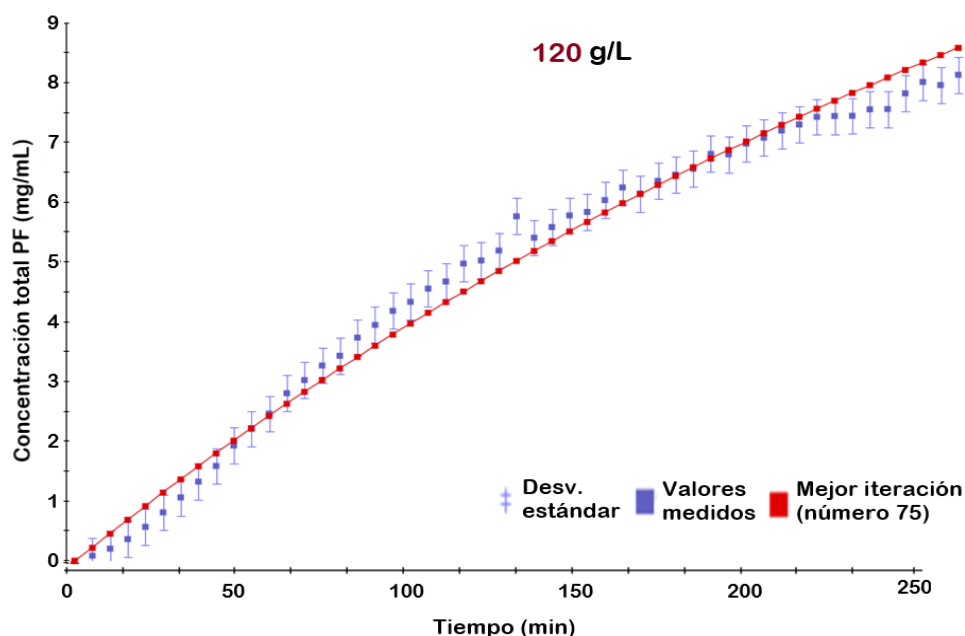
**Figura 6.7.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 75 g/L.



**Figura 6.8.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 90 g/L.



**Figura 6.9.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 105 g/L.



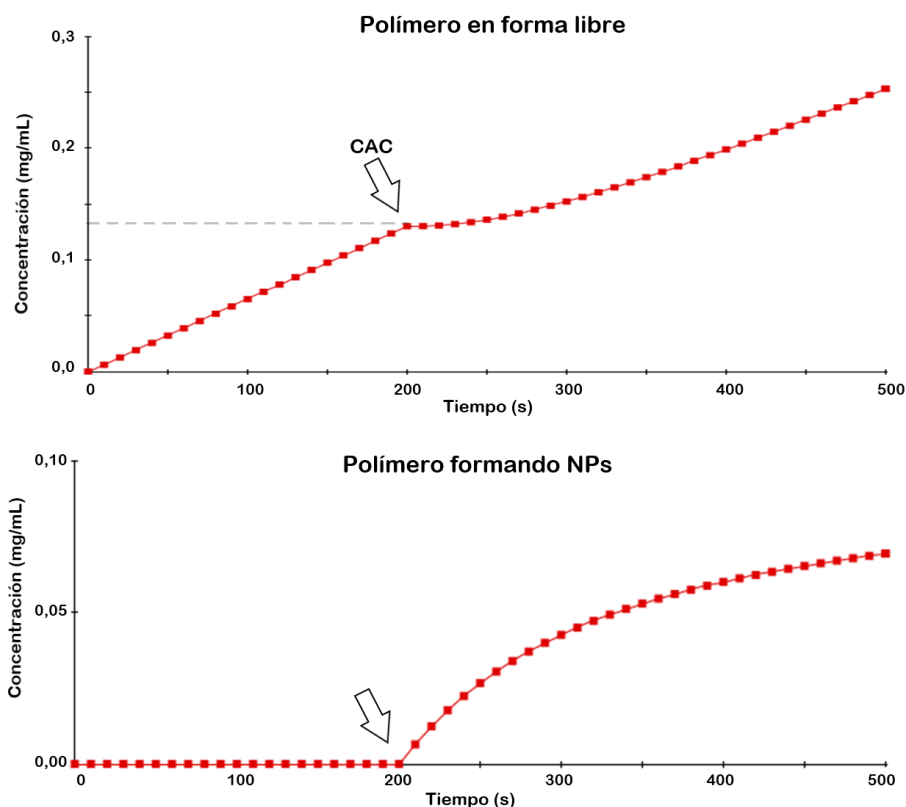
**Figura 6.10.** Ajuste de los datos experimentales para la concentración inicial de sacarosa de 120 g/L.

En las figuras anteriores (6.5 a 6.10) se puede observar cómo el modelo es capaz de predecir de forma más precisa los resultados de las concentraciones más bajas de sacarosa, mientras que se observan más diferencias entre los datos experimentales y los predichos a concentraciones mayores.

Esto podría indicar que hay otras sustancias o moléculas que juegan un papel importante en la velocidad de reacción a altas concentraciones, pero que desconocemos, y deberían ser introducidas en un modelo si se busca una mayor precisión. Sin embargo, la inclusión de más parámetros complicaría la ejecución de un modelo que es capaz de predecir eficazmente los resultados experimentales.

## 5. RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES

Una vez que se han determinado los parámetros necesarios para la validación del modelo, es posible realizar algunas simulaciones utilizando el software gPROMS, para comprender mejor los procesos cinéticos y de auto-ensamblado de las nano-partículas. En la figura 6.11 se representa la evolución de la concentración del polímero que está libre (figura superior) y el polímero que está formando nano-partículas (figura inferior), en los primeros instantes (hasta 8 minutos) de la reacción.

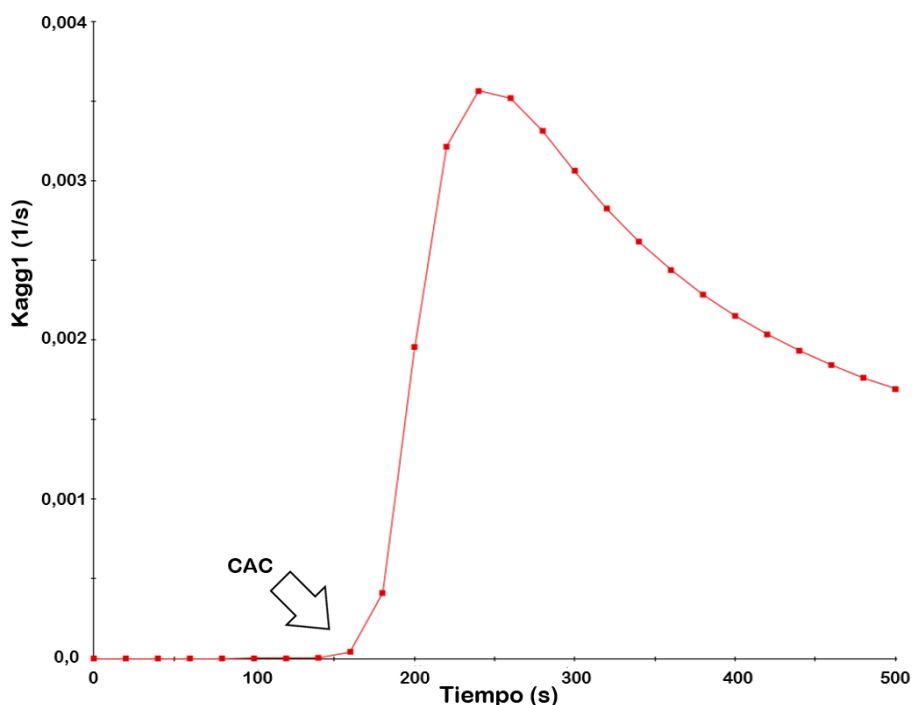


**Figura 6.11. Simulación de la concentración de polímero en el sistema (en forma libre y formando nanopartículas).**

Como se puede observar en las gráficas de la figura 6.11., toda la cantidad de polímero producido en los instantes iniciales se encuentra en forma libre hasta que se alcanza una concentración crítica (CAC), marcada por la flecha. En ese momento se observa un *plateau* en el caso de la forma libre, pues se produce una reorganización de las cadenas, provocando el inicio de la curva que se observa en la gráfica inferior. La concentración que se señala en la gráfica, coincide de forma aproximada, con la estimada de forma empírica (rango de 0.10 a 0.20 mg/mL) al estudiar el entorno hidrofóbico del pireno. De acuerdo con las simulaciones, esta CAC tomaría un valor de 0.13 mg/mL.

La formulación del modelo, inspirada en un modelo DLCA, implica que la constante de agregación ( $K_{agg1}$ ) no toma un valor constante durante toda la reacción, sino que depende del radio de la nanopartícula, y de la concentración del polímero en forma libre. Por esta razón, se realizó una simulación para estudiar cómo era la variación de dicha constante a lo largo de los primeros instantes de la reacción, cuando comienza la re-organización de las cadenas. Los resultados de esta simulación se representan en la figura 6.12.





**Figura 6.12. Simulación de los valores de  $K_{agg1}$  en los instantes iniciales de la reacción.**

En la gráfica de la figura 6.12 se puede observar cómo el valor de la constante de agregación es cero hasta que se acerca al valor de la CAC, que según la figura 6.11, se alcanza a los 200 segundos de reacción. En ese momento se produce un importante salto hasta un valor máximo, que se corresponde con la re-organización inicial y abrupta de las cadenas. Tras este máximo se observa una reducción moderada, cada vez menor, de dicho valor, que va ligado al tamaño de la partícula, debido a la asunción de un modelo tipo DLCA.

Cuando el diámetro de las partículas se ha estabilizado (en gráficas de capítulos anteriores se observa hacia los 15-20 minutos, ver

figuras 5.22 o 5.29), el valor de  $K_{agg1}$  permanece constante, manteniendo el equilibrio entre producción de polímero y formación de nanopartículas por auto-ensamblado. En este caso, toma un valor de  $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , que puede ser comparado con  $2.3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , que es el valor de la constante de desagregación ( $K_{agg2}$ ). Por tanto, se puede concluir que, una vez estabilizado el proceso, la agregación ocurre aproximadamente 60 veces más rápido que la desagregación.

## **6. CONCLUSIONES**

En este capítulo se ha propuesto un modelo para estudiar la cinética de producción de levan cuando se utiliza la enzima de forma libre, así como, de forma integrada, el proceso de auto-ensamblado de las nanopartículas. Para conseguir dicho modelo fueron necesarios algunos experimentos adicionales a los presentados en el capítulo quinto, tales como la comprobación de la existencia de un envenenamiento enzimático por parte del polímero, así como la verificación de una cinética de desagregación de las partículas.

El modelo propuesto explica de forma satisfactoria los resultados experimentales obtenidos por la variación de sustrato, y es capaz de predecir eficazmente las constantes involucradas en el proceso. Las simulaciones realizadas permiten comprender de una forma más precisa el proceso de producción de estas nanopartículas, y un mejor control del proceso de auto-ensamblado de las micelas poliméricas, que constituye la gran limitación para una aplicación sistémica de éstas como tratamiento.



# **Capítulo 7**

---

**Aproximaciones  
biotecnológicas para producir  
levan: estudio de transferencia  
de materia y evaluación  
económica**



## **1. INTRODUCCIÓN**

El trabajo con enzimas lleva asociado unos elevados costes de producción debido al elevado precio de este catalizador, que tiene que ser producido por técnicas recombinantes y altamente purificado en procesos muy costos. La producción de diferentes compuestos con la inmovilización de enzimas ofrece una gran variedad de ventajas con respecto a la producción en forma libre. Algunas de esas ventajas son las siguientes:

- Incremento del tiempo de vida útil de la enzima, es decir, no necesita ser añadida de nuevo en cada ciclo de producción, sino que es conservada para varias sesiones.
- Incremento de la estabilidad en condiciones no óptimas, tales como diferente temperatura o diferente pH.
- Posibilidad, en algunos casos, de recuperar la enzima del soporte, y reutilizarla tras un tiempo en ciclos de producción futuros.

La técnica de inmovilización ha sido ampliamente usada para retener en soportes diferentes enzimas involucradas en procesos industriales. Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, el coste de desarrollar un buen sistema de inmovilización de enzimas, así como las limitaciones de transferencia de materia que éste pudiese tener, han provocado que no se hayan publicado muchos trabajos en la bibliografía explorando esta posibilidad para la enzima objeto de estudio (levan-sacarasa).

Se han realizado varios estudios donde se ha considerado el trabajo con la enzima levan-sacarasa, pero en su forma libre. Sin embargo, pocos estudios han considerado la posibilidad de trabajar con la enzima de forma inmovilizada en un soporte sólido. Algunas de las inmovilizaciones ensayadas llevaban implícita la formación de un enlace covalente entre las enzimas y los soportes, que a pesar de los resultados satisfactorios, se veía considerablemente modificada la estabilidad, selectividad de los sustratos y las velocidades de catálisis eran modificadas (Hill et al., 2016; Jang et al., 2000; Chiang et al., 2009). Por otro lado, Esawy et al. (2008) llevaron a cabo la inmovilización de esta enzima en esferas de alginato reticulado sobre cloruro de calcio, pero con un rendimiento de atrapamiento inferior al 5% por las condiciones empleadas.

También Chiang et al. (2009) trataron de inmovilizar la enzima por atrapamiento, en esta ocasión, en esferas de quitina. En este caso, realizaron preliminarmente una modificación genética de la bacteria *Z. mobilis*, para generar un dominio en la proteína que facilitase la inmovilización. En este caso, el rendimiento de inmovilización conseguido fue elevado, pero se producía un descenso en la actividad en comparación con la enzima libre entre el 35-60%.

A pesar de la existencia de algunos trabajos que exploran la vía de la inmovilización enzimática, no se han encontrado trabajos en la bibliografía que traten esta posibilidad desde el punto de vista industrial, analizando cómo afectaría el diseño de un reactor con estos soportes, y estudiando el efecto que tendría sobre la cinética, y la transferencia de



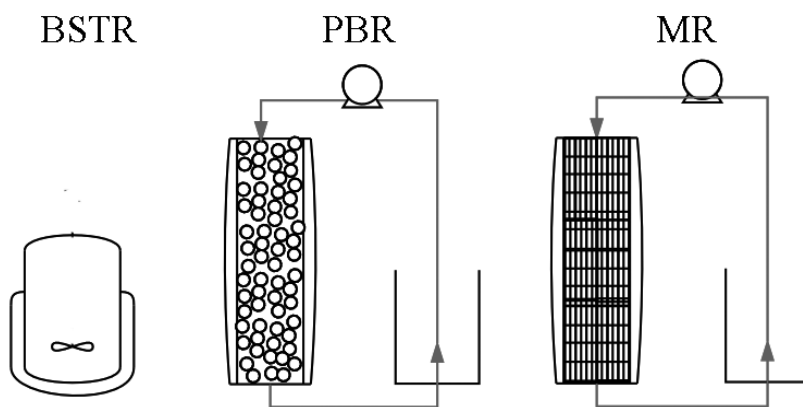
materia. La disposición de los soportes en reactores se aproximaría más a la realidad de cara a implementar este proceso a nivel industrial.

Por esta razón, a lo largo de este capítulo se va a estudiar la inmovilización de la enzima en dos soportes diferentes, y la configuración de este soporte como reactor y será comparado con la producción tradicional en un tanque de mezcla perfecta. Se estudiará el efecto de los parámetros de operación, así como de las modificaciones en la cinética enzimática o la transferencia de materia. Además, se caracterizará la forma y la carga superficial de las nanopartículas obtenidas desde el polímero producido de las diversas formas.

Finalmente, se llevará a cabo una evaluación económica de forma muy preliminar que permitirá estimar la reducción de costes que se generaría en una planta, si se implantase cualquiera de los dos procesos que se detallan a continuación.

## 2. DISEÑO DEL PROCESO Y PREPARACIÓN DE LOS SOPORTES

Se diseñaron tres tipos de reactores diferentes, dos de ellos con la enzima inmovilizada y el otro con la enzima libre. El reactor que contenía la enzima libre estará perfectamente agitado en un reactor que trabaja en discontinuo, que será nombrado a lo largo del capítulo como BSTR, por sus siglas en inglés: *Batch Stirred Tank Reactor*. Los reactores heterogéneos (con la enzima inmovilizada) se denominarán PBR, por sus siglas en inglés *Packed Bed Reactor*; y MR, por sus siglas en inglés *Monolithic Reactor*. En la Figura 7.1., se muestra un esquema de la forma y diseño de cada uno de los tres reactores. La enzima utilizada en todos los casos es la misma que se ha adquirido para los experimentos descritos en capítulos anteriores (Fructosyltransferase 68A d *B. subtilis*), a la compañía americana *Creative Enzymes*. La enzima fue conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un medio de HEPES-sodio a pH 7.5 hasta su uso.



**Figura 7.1.** Esquema de las tres configuraciones de reactores estudiadas.

A continuación, se describen las condiciones de operación de cada uno de los reactores:

### **2.1. Reactor Batch de tanque agitado (BSTR)**

Para realizar los experimentos, se empleó un volumen de 30 mL de una disolución de sacarosa (a diferentes concentraciones dependiendo de los experimentos) en el reactor con 20  $\mu\text{L}$  de la disolución stock de la enzima ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), quedando finalmente una concentración de enzima de  $0.67 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El tanque estuvo agitado de forma magnética a 300 rpm, con un agitador de 8 mm de ancho; y termostatzado con una camisa de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , que, como se describió en capítulos previos, es una temperatura adecuada para buen rendimiento de catálisis.

### **2.2. Reactor de lecho fijo (PBR)**

La retención de enzimas en esferas de alginato ha sido uno de los procesos más empleados tradicionalmente para la inmovilización de enzimas. Estos soportes presentan poros y generan una estructura que permite la difusión de sustratos y productos de la enzima. En el diseño de este sistema, el reactor fue empaquetado con esferas de alginato-calcio de entre 2 y 3 mm de diámetro.

El proceso de generación de las esferas, que contienen la enzima activa, está basado en la reticulación que se produce cuando se expone una gota de alginato (donde va dispersada la enzima) sobre una disolución de cloruro de calcio. Se preparó una disolución de alginato de sodio al 2% en peso y la enzima se añadió dentro de dicha disolución

hasta alcanzar una concentración de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dicha disolución se añadió gota a gota sobre otra de cloruro de calcio, también preparada al 2% en peso con una jeringuilla y una aguja de diámetro 0.50 mm. Tras esto, las cápsulas fueron lavadas tres veces con agua desionizada para reducir la cantidad de calcio libre en la disolución.

El rendimiento de encapsulación se pudo calcular mediante el uso de *Biodrop*, un espectrofotómetro de alta precisión, que cuantifica la proteína por absorbancia a 280 nm. De esta forma se midió la cantidad de proteína libre, y por diferencia se calculó el rendimiento de atrapamiento. Las esferas de alginato se introdujeron en el reactor, que presentaba las dimensiones: longitud de lecho de 9 cm y anchura de 1.6 cm.

Se realizaron varios experimentos con diferente carga de esferas, es decir, diferente porosidad, para también poder estudiar este efecto. Cuando todas las esferas fueron cargadas, el experimento comenzó con el bombeo de 20 mL de disolución de sacarosa (a diferentes concentraciones para estudiar la cinética), y con diferentes caudales; gracias al uso de una bomba Pumpdrive 5201 C8 Cassette, Heidolph, Alemania. Para el seguimiento de la reacción, se tomaron muestras del tanque auxiliar (en recirculación), tal y como se observaba en la Figura 7.1.

Las características del PBR se resumen a continuación:

- Porosidad: variable, de 0.64 a 0.81.
- Área superficial: de  $1470 \text{ cm}^2$  a  $821 \text{ cm}^2$
- Diámetro de las esferas: 0.21 cm

- Longitud del reactor empaquetado: 9 cm
- Diámetro del reactor empaquetado: 1.6 cm

### **2.3. Reactor monolítico (MR)**

A pesar de las ventajas que ofrece el reactor de lecho fijo, presenta también ciertas limitaciones que animan a buscar alternativas para mejorar los procesos. El principal problema que presentan estos reactores es la elevada pérdida de carga generada cuando se aumenta el caudal de trabajo, obligando a trabajar con bombas a elevada potencia que contrarreste este fenómeno.

Trabajos previos del grupo de investigación concluyeron con la producción de un monolito super-poroso de agarosa, con gran capacidad para inmovilizar proteínas en su interior. Basados en el procedimiento experimental descrito por Elviro et al. (2019), se sintetizó dicho monolito por una emulsión de un gel polisacárido como la Agarosa D5 y un agente porógeno. Este agente porógeno está formado por un disolvente orgánico (ciclohexanol) y un detergente (Tween 80) que genera una estructura superporosa cuando se alcanzan temperaturas por debajo de la temperatura de gelificación. Más tarde, el agente porógeno se libera tras algunos lavados. El detergente se debe comportar como un agente activador de superficies para estabilizar la emulsión de aceite en agua. La estructura del monolito de agarosa super-poroso generado presenta las siguientes características:

- Porosidad: 0.34
- Área superficial: 779.53 cm<sup>2</sup>
- Diámetro medio del poro: 38.1 μm

- Espesor medio entre los poros: 68.1  $\mu\text{m}$
- Longitud del monolito: variable
- Anchura del monolito: 1.6 cm

Cuando el monolito ya se ha sintetizado, se introduce en las columnas controladas termostáticamente a 37°C. Hacia la columna se bombea una disolución que contiene la enzima levan-sacarasa con un caudal de 1.5 mL·min<sup>-1</sup> (Pumpdrive 5201, C8 Cassette, Heidolph, Alemania) en tampón fosfato a pH 7.4. La eficiencia de la adsorción se determinó experimentalmente por espectrofotometría del mismo modo que en PBR (*Biodrop*). La inmovilización ocurre por la interacción que ocurre entre el ión cobre presente en la superficie del monolito y las histidinas superficiales presentes en la enzima levan-sacarasa.

Cuando se observa que la columna ha retenido gran cantidad de enzima, se realiza un lavado de ésta, y se comienza a operar, pasando 20 mL de una disolución de sacarosa (a diferentes concentraciones) hacia la columna y con recirculación. Del mismo modo que en la anterior configuración, la reacción se sigue por medida de la concentración de azúcar en el tanque auxiliar, como se apreciaba en la figura 7.1.

### **3. RENDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN**

Como se mencionó en el apartado anterior, los rendimientos de la inmovilización de la enzima leván-sacarasa se determinaron por espectrofotometría de alta precisión (*Biodrop*), midiendo la absorbancia a 280 nm de la proteína (enzima) que no ha resultado unida.

El porcentaje de inmovilización de la enzima (cantidad de enzima retenida sobre cantidad total) en las esferas de alginato para constituir el PBR se sitúa en el intervalo de 72-84%, según los diferentes experimentos. Estos resultados suponen un incremento considerable de eficacia con respecto al trabajo publicado previamente con este sistema, que alcanzaba solamente valores del 5% de rendimiento (Esawy et al., 2008). Esta diferencia es explicable por las diferentes concentraciones de cloruro de calcio empleadas en el experimento, que permiten un rápido entrecruzamiento, y, por tanto, limitan la difusión de la enzima hacia el exterior, en favor de su gradiente de concentración.

En el caso del reactor monolítico, el rendimiento de inmovilización es cercano al 100%, dado que se trata de una interacción química, más específica, que el proceso físico de atrapamiento. Este reactor es capaz de inmovilizar grandes cantidades de enzima, llegando incluso a  $6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  de soporte. Sin embargo, se inmovilizaron siempre  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  de soporte, pues se consideraba cantidad suficiente para llevar a cabo la catálisis enzimática con este soporte.

## 4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

Con el objetivo de estudiar la catálisis enzimática una vez producida la inmovilización de la enzima, se ensayaron diferentes cantidades de sacarosa inicial en los dos reactores heterogéneos y se compararon con los resultados ofrecidos por el reactor homogéneo.

Como la mayoría de las enzimas, se observa que la enzima levansacarasa sigue una cinética del tipo Michaelis-Menten, que se encuentra resumida en la ecuación 7.1.

$$\frac{dC_S}{dt} = v_0 = -\frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M + C_S} = \frac{K_{cat} \cdot [E] \cdot C_S}{K_M + C_S} \quad (\text{Ec. 7.1.})$$

La determinación de los parámetros de la ecuación se realizó en el reactor homogéneo donde se asume que no existen limitaciones de transferencia de materia, y todo el fenómeno se encuentra controlado por la cinética. En la Tabla 7.1. se muestran los datos de las velocidades iniciales alcanzadas con las diferentes concentraciones. Se asume una velocidad global que tiene las contribuciones de hidrólisis y transfructosilación.

Con estos datos, se puede realizar la linealización de Lineweaver-Burk, que arroja los siguientes resultados:  $K_M = 229 \text{ mM}$  y  $K_{cat} = 20.75 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Como se conoce la cantidad de enzima utilizada, es posible determinar la velocidad máxima de la reacción ( $V_{max}$ ), que en este caso es  $13.7 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ .



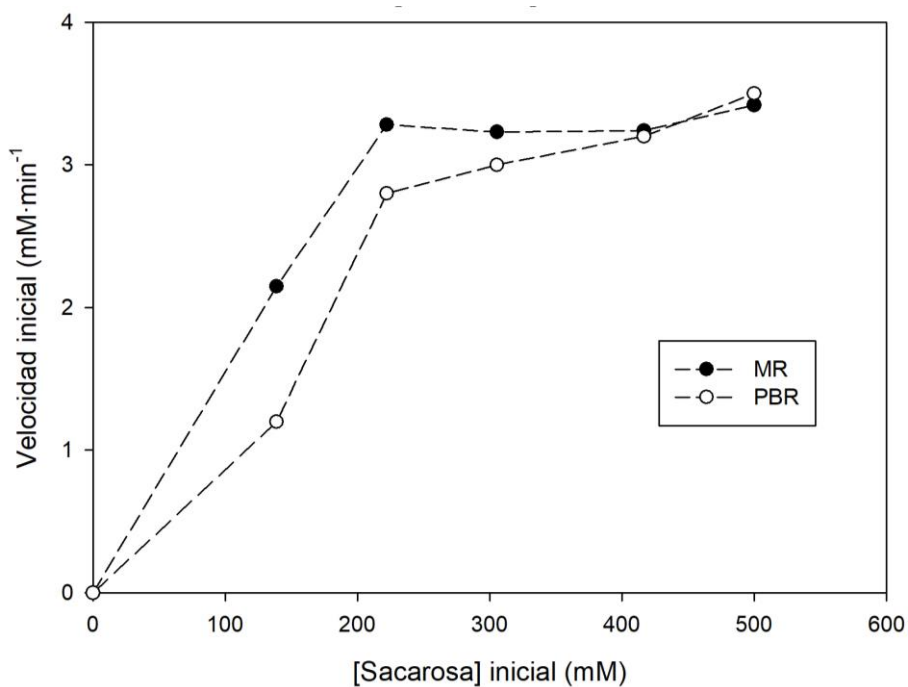
**Tabla 7.1. Velocidad inicial obtenida en función de la concentración inicial de sustrato.**

Concentración de sustrato (g/L)	Velocidad inicial (mM/min)
15	0
25	1,17
40	4,55
60	13,8
75	13,7
90	14,4

Estos resultados están en el mismo orden de magnitud que los publicados por Tian et al. (2014) para la leván-sacarasa de *Bacillus amyloliquefaciens* ( $0.43 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ); donde este incremento de actividad puede deberse al alto grado de pureza de la enzima utilizada en el experimento.

Una vez obtenidos estos parámetros, se pueden comparar con los resultados que se obtendrán en los experimentos de los reactores heterogéneos, que se resumen en la Figura 7.2.

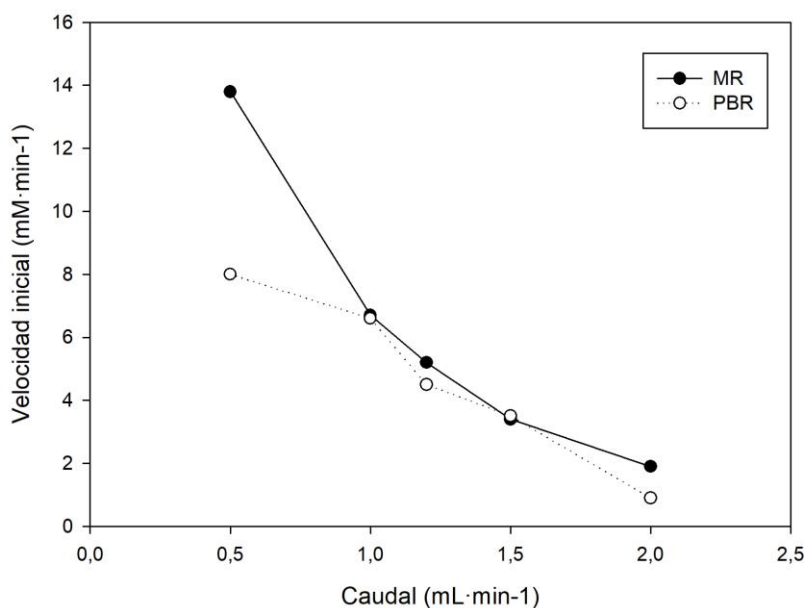
En dicha figura se observa que los valores de  $K_M$  son constantes en los dos sistemas heterogéneos, y que se necesita semejante cantidad de sustrato para trabajar en la velocidad máxima de catálisis. De estos resultados se concluye que existe un proceso importante de transferencia de materia que es el que modifica considerablemente el proceso global. Por esta razón, en la sección 7.10. se presentará un modelo que tratará de explicar esas diferencias en la velocidad de catálisis observada.



**Figura 7.2.** Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de los dos reactores heterogéneos.

## 5. EFECTO DEL CAUDAL

El objetivo final de este capítulo es la formulación de un modelo de transferencia de materia, en el que el caudal de trabajo es un parámetro esencial. Para poder formular dicho modelo, es necesario el estudio del caudal con el que se están alimentando las columnas dentro del sistema con recirculación que se describió en apartados anteriores. Para ello, se llevaron a cabo diferentes experimentos modificando el caudal en los reactores de lecho fijo y en el reactor monolítico, manteniendo la concentración inicial de sustrato en  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , para asegurar que el experimento se realiza a velocidad máxima. También se mantuvieron constantes la porosidad en el PBR (0.65) y la longitud en el monolito (2 cm). Mediante el análisis de los azúcares reductores se pudo determinar la velocidad inicial de reacción para diferentes caudales; y éstas se encuentran representadas para ambos tipos de reactores en la figura 7.3.



**Figura 7.3.** Efecto del caudal de operación en los dos reactores heterogéneos.

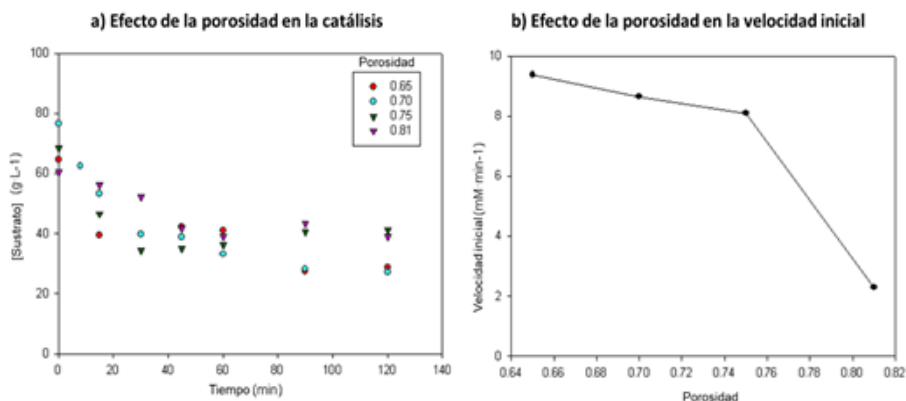
En la figura 7.3. se observa que existe una gran influencia del caudal en la velocidad de catálisis de la enzima. Los mejores resultados son los que se obtienen a bajos caudales, mientras que con caudales altos (más de  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) las velocidades de catálisis son muy reducidas. Este hecho se explicará con más detenimiento en la sección 7.10. (modelo de transferencia de materia), pero la principal conclusión derivada de estos datos es: que una baja velocidad lineal en la columna (derivada de un bajo caudal), permite un mayor tiempo de interacción entre el sustrato y el soporte donde se encuentra la enzima. Este mayor tiempo de interacción permite la polimerización y, por tanto, una mayor velocidad de conversión; y es más semejante a los experimentos realizados en discontinuo.

## **6. EFECTO DE LA POROSIDAD EN EL REACTOR DE LECHO FIJO**

La porosidad en un reactor de lecho fijo constituye otro de los parámetros importantes a tener en cuenta para la formulación de un modelo de transferencia de materia. La mayor o menor cantidad de soporte y de huecos va a afectar al flujo existente en el interior de la columna, así como a la mayor o menor presencia de interfases líquido-sólido, que condicionarán el fenómeno de transferencia del sustrato para su posterior catálisis.

El efecto de la porosidad (proporción de huecos en el reactor) en la “transfructosilación” se estudió en el reactor de lecho fijo con la realización de diferentes experimentos que contenían cada uno distinto grado de empaquetamiento. Concretamente se estudiaron cuatro porosidades diferentes: 0.65, 0.70, 0.75 y 0.81. Sin embargo, a pesar de introducir mayor o menor cantidad de esferas en la columna, se mantuvo constante la cantidad de enzima presente en la columna, de tal forma que se varió la concentración de enzima por gramo de soporte, con el fin de estudiar solamente el efecto conformacional de la porosidad, y que esto no se viese afectado por la cantidad total de catalizador preparado.

Los resultados obtenidos se muestran resumidos en la Figura 7.4.



**Figura 7.4. Efecto de la porosidad en el reactor de lecho fijo.**  
**A) Cinética de desaparición de sustrato para diferentes velocidades.**  
**B) Cálculo de la velocidad inicial y representación en relación con la porosidad del reactor.**

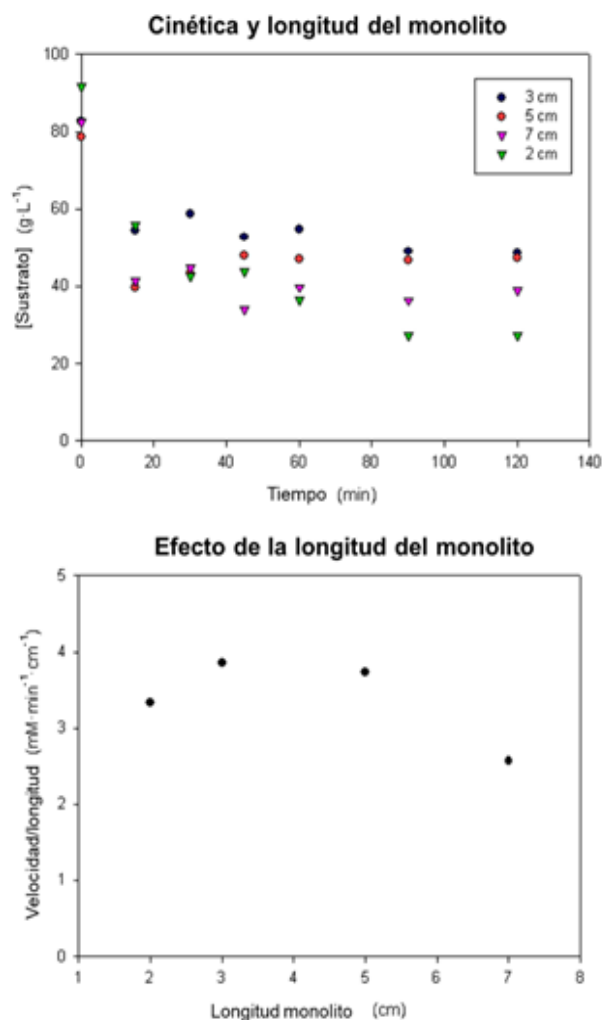
Como se puede observar en la figura anterior (7.4), la porosidad no tiene un papel relevante o considerable en la eficiencia de la reacción cuando se trabaja con grados altos de empaquetamiento (porosidades inferiores a 0.75). Sin embargo, sí se observa un salto considerable cuando el volumen de huecos excede dicho valor crítico.

En esta situación (por ejemplo: 0.81) se presenta un lecho poco empaquetado, donde la baja eficiencia se puede explicar por las limitaciones de la transferencia de materia. La excesiva presencia de huecos en la columna incrementa considerablemente la resistencia a la transferencia de materia, de tal forma que el proceso pasa a estar gobernado por la transferencia de materia en lugar de la cinética, y existe mucho espacio libre sin proximidad de catalizador (debido al excesivo volumen de huecos). En el apartado 7.10. (modelo de transferencia de materia) se establecerán las condiciones más apropiadas para obtener el equilibrio ideal entre cinética y transferencia de materia.

## **7. EFECTO DE LA LONGITUD EN EL REACTOR MONOLÍTICO**

El principal objetivo de este capítulo es explorar la posibilidad de nuevas configuraciones de reactores, que reduzcan costes, y faciliten el escalado del proceso a volúmenes mayores. Por esta razón, se ensayaron diferentes longitudes de monolito, manteniendo siempre constante la cantidad de enzima por longitud de monolito, es decir, el parámetro mg enzima/cm de monolito se mantuvo constante. Se ensayaron 4 longitudes diferentes de reactor monolítico (2, 3, 5 y 7 cm) y los resultados se muestran en la figura 7.5. En la gráfica superior se muestra la cinética de desaparición de sustrato (sacarosa), desde la cual se calcula la relación de velocidad y longitud del monolito que se representa, en la gráfica inferior, para las cuatro longitudes estudiadas.

Si se analiza la figura inferior, se puede observar que la velocidad inicial relativizada por unidad de longitud ( $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) es prácticamente constante e independiente de la longitud del monolito. Este hecho sugiere la posibilidad de escalar el soporte a volúmenes superiores, que serían necesarios para una producción a gran escala. Sin embargo, son necesarios más estudios para analizar cómo el incremento de la longitud (por encima de 7 cm) puede afectar a la hidrodinámica en la columna.



**Figura 7.5. Efecto de la longitud del monolito. A) Cinética de desaparición de sustrato para diferentes longitudes de monolito. B) Cálculo de la velocidad inicial, normalizada por la longitud y representación frente a la longitud del mismo.**



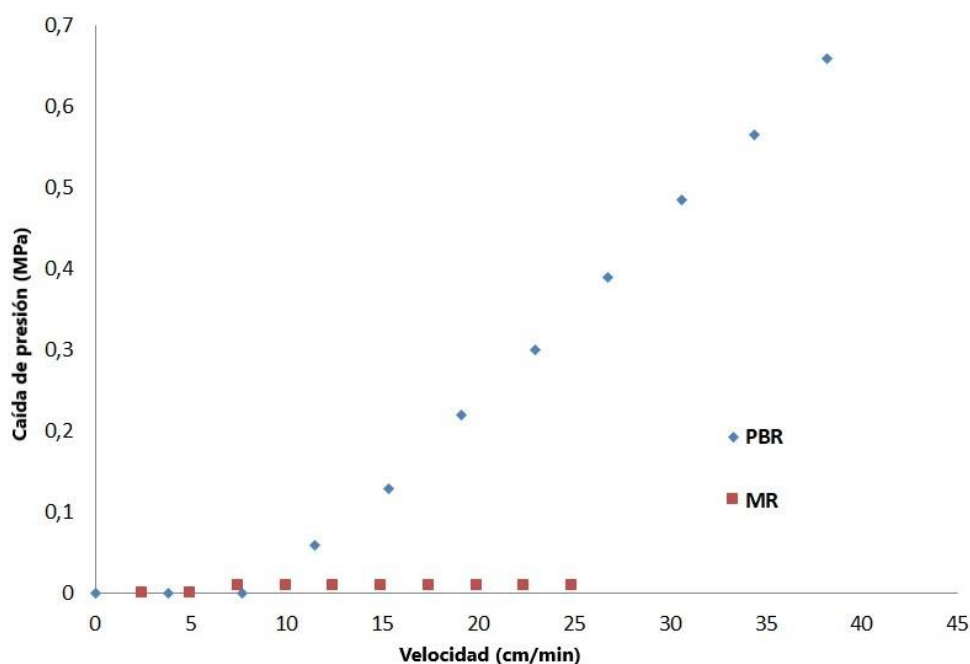
## **8. PÉRDIDA DE CARGA EN AMBOS REACTORES**

El proceso de escalado suele estar limitado en muchas ocasiones por la pérdida de carga que ofrecen los equipos al incrementarse los volúmenes. Particularmente, la pérdida de carga es un fenómeno a tener en cuenta cuando nos encontramos lechos empaquetados o porosos. Con los nuevos reactores diseñados, en columna, se hace necesario el estudio de la pérdida de carga que ofrecen dichos sistemas. Para ello, se determinó mediante el uso del equipo FPLC Akta Purifer 10, con diferentes caudales, para los que se fue midiendo en cada uno de ellos, la diferencia de presión observada entre la entrada y la salida de la columna. Como base para los experimentos, se utilizó el reactor monolítico de 2 cm y en el lecho empaquetado una altura de 3 cm y un valor de porosidad de 0.6.

En la Figura 7.6. se muestran los resultados de la pérdida de carga ofrecida por ambos sistemas, y relativizada a su vez, por unidad de longitud (MPa/m). En ambos casos se puede observar que cuando se trabaja a bajos caudales (inferiores a  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), no hay un incremento considerable o significativo de la caída de la presión en las dos columnas. Si se sigue incrementando el caudal, la diferencia de la presión empieza a ser significativa, donde se aprecia que es más importante en el reactor de lecho fijo o empaquetado que en el reactor monolítico.

A pesar de este incremento final, conviene recalcar que el proceso de escalado sería posible llevarlo a cabo debido a que no se puede

considerar como crucial la pérdida de carga en estas columnas hasta que se trabaja a caudales elevados (superiores a  $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Es posible, que no se lleguen a utilizar si quiera esos caudales, dado que el volumen de producción de levan deseado no haría preciso trabajar por encima de 2 litros por hora.



**Figura 7.6.** Representación de la pérdida de carga generada por ambos soportes a diferentes caudales de operación.

## **9. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA**

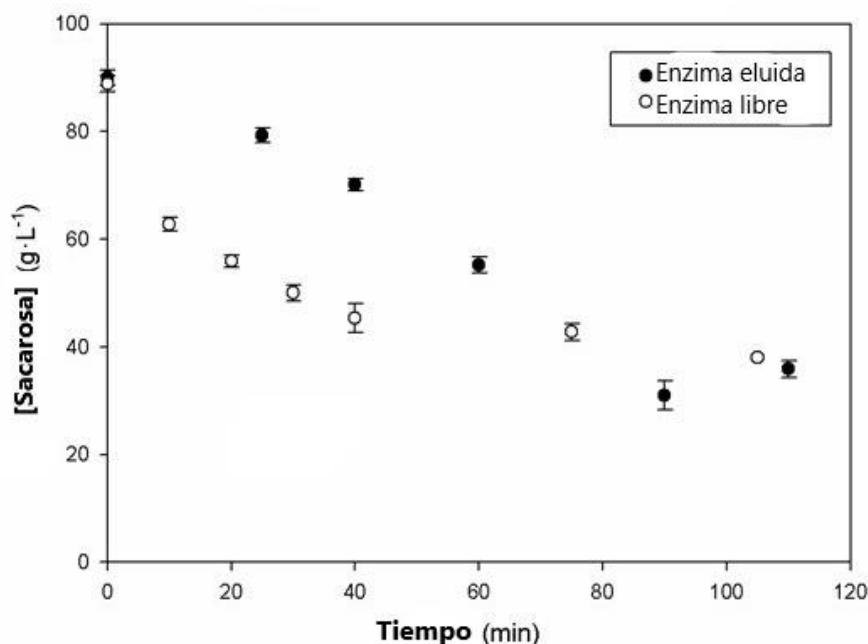
Tal y como se describió previamente, una de las principales ventajas de la inmovilización de enzimas en soportes es el incremento de la estabilidad de la enzima, lo cual supone una valorización añadida para el escalado del proceso a volúmenes mayores. Para analizar cuánta estabilidad se consigue con estas inmovilizaciones se repitió el mismo experimento cada 24 horas, utilizando el mismo soporte con la misma enzima, las mismas concentraciones de fructosa e iguales porosidades, longitudes y caudales, para ambos sistemas heterogéneos. Tras el experimento se estudiaron las velocidades iniciales y se compararon con el fin de analizar cuánta actividad enzimática se perdía.

En el caso del reactor monolítico, se observó que la actividad de la enzima permanecía constante hasta quince días después de la inmovilización, donde ya se observaba cierta pérdida de actividad enzimática. En el caso del reactor de lecho fijo, la actividad de la enzima permanecía invariable hasta ocho días después de la preparación de la columna. Estos resultados sugieren que es posible la aplicación industrial del proceso dado que el número de ciclos que se pueden realizar sin necesidad de renovación de la enzima son elevados.

Además de esto, en el caso del reactor monolítico, es posible la elución de la enzima retenida en el soporte. El proceso de elución se realiza con ácido tetra-acético de etilendiamina (EDTA) a una concentración de 50 mM. Este ácido es un quelante de cobre, y es

precisamente este metal el responsable de la retención de la enzima, pues se encuentra reteniéndola a través de su histidina superficial. La acción del EDTA supone la captación del cobre, y con él, la enzima que lleva asociada. De esta forma, la enzima vuelve a la fase líquida del reactor, desde el soporte sólido, y puede ser reaprovechada.

Una vez recuperada la enzima en la fase líquida, se estudió su actividad remanente, al añadir sustrato y seguir la reacción mediante el análisis de azúcares reductores (de la misma forma que se hizo en los casos anteriores). En la figura 6.7. se muestra la velocidad de catálisis de la enzima inicial libre y la enzima eluida de la columna, siguiendo este procedimiento que se acaba de describir.



**Figura 7.7. Cinética de desaparición de sustrato para la enzima tras el proceso de elución y para la enzima en su estado nativo, libre.**

En la figura 7.7 se observa que la velocidad máxima de catálisis decrece desde  $14 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$  a  $3.6 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ , pero, sin embargo, se alcanza la misma conversión con el paso del tiempo (la enzima eluida alcanza dichos valores a los 90 o 100 minutos de la reacción). Estos datos sugieren que la enzima puede ser reutilizada tras su retención en el reactor monolítico y posterior elución, de nuevo, como enzima libre. El descenso en la actividad enzimática es fácilmente explicable por la presencia de reactivos como el EDTA que son utilizados para la elución, y pueden afectar a la estabilidad y funcionalidad de la enzima.

## 10. MODELO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA

La formulación de un modelo de transferencia de materia, que explique los fenómenos observados en los experimentos se convierte en un paso clave para tratar de reducir las resistencias al transporte de materia, y, por tanto, asegurar un mejor rendimiento de producción.

De cara a la formulación del modelo de transferencia de materia, es necesario realizar ciertas suposiciones previamente, que permitan simplificar el modelo, sin que pierda precisión en la predicción del comportamiento del fenómeno.

Estas suposiciones son igualmente válidas para el reactor de lecho fijo y para el reactor monolítico; y son las siguientes:

- La distribución de las enzimas en el reactor es considerada constante a lo largo y ancho del mismo (ecuación 7.2.).

$$\frac{\partial C_{enz}}{\partial z} = 0; \frac{\partial C_{enz}}{\partial r} = 0 \quad (\text{Ec. 7.2.})$$

- Debido a la configuración de los reactores, la dispersión radial puede considerarse despreciable y la concentración de sustrato solamente varía en el eje Z (ecuación 7.3.).

$$\frac{\partial C_S}{\partial z} \neq 0; \frac{\partial C_S}{\partial r} = 0 \quad (\text{Ec. 7.3.})$$

- Para el cálculo de la transferencia interna, se considera constante la concentración de sustrato en el caldo externo (*bulk*). Este valor se calcula como la media entre la concentración de sustrato en la entrada y la concentración de sustrato en la salida. (ecuación 7.4.).

$$C_{Sb} = \frac{C_S^{input} - C_S^{output}}{2} \quad (\text{Ec. 7.4.})$$

En el caso del reactor monolítico, se asume una distribución paralela de los canales y perpendiculares entre ellos, formando una rejilla; donde el canal puede ser considerado como un cilindro de longitud definida.

## **10.1. Transferencia de materia en reactor de lecho fijo**

El flujo alrededor de partículas esféricas en un lecho fijo viene explicado por la ecuación semi-empírica de Frössling (ecuación 7.5.).

$$Sh = 2 + 0.6\sqrt{Re_p}\sqrt[3]{Sc} \quad (\text{Ec. 7.5.})$$

Donde los números adimensionales que emplea: Sherwood (Sh), Schmidt (Sc) y Reynolds (Re) se definen como sigue en las ecuaciones 7.6., 7.7., 7.8.

$$Sh = \frac{K_f d_p}{D'_S} \quad (\text{Ec. 7.6.})$$

$$Re_p = \frac{d_p \cdot \rho \cdot v}{\mu_f} = \frac{d_p \cdot \rho \cdot Q}{\mu_f \cdot A} \quad (\text{Ec. 7.7.})$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D'_s} \quad (\text{Ec. 7.8.})$$

El valor de la difusividad tiene que ser corregido hacia una difusividad efectiva del sustrato en la columna ( $D'_s$ ), considerando la tortuosidad del medio. La distribución estocástica de las esferas genera poros que afectan al fenómeno de la difusión, y, por tanto, la molécula de sustrato debe realizar más trayecto para alcanzar el punto de destino deseado. La corrección del valor de la difusividad puede hacerse gracias a la correlación propuesta por Neale y Nader (1973), donde se estima esta difusividad corregida desde la tortuosidad (ecuación 7.9.), que a su vez es calculada desde la porosidad (ecuación 7.10.).

$$D'_s = \frac{D_s}{\tau^2} \quad (\text{Ec.7.9.})$$

$$\tau^2 = \frac{3-\varepsilon}{2} \quad (\text{Ec.7.10.})$$

La porosidad es definida como la fracción de huecos presente en el medio, y por tanto se calcula como el cociente del volumen de huecos entre el volumen total, como se observa en la ecuación 7.11.

$$\varepsilon = \frac{\text{Volumen de huecos}}{\text{Volumen total}} \quad (\text{Ec.7.11.})$$

Aplicando la ecuación de Frössling, desde el número de Sherwood, se calcula el valor del coeficiente de transferencia líquido-sólido ( $K_f$ ), que permite a su vez, calcular el número de Damköhler ( $Da$ ), que se define, para una cinética de Michaelis-Menten como la que nos ocupa, de acuerdo con la ecuación 7.12.



$$Da = \frac{V_{max}}{K_f \cdot a \cdot K_M} \quad (\text{Ec. 7.12.})$$

Por otra parte, es necesario calcular el módulo de Thiele ( $\phi$ ) para determinar el factor de eficacia de la transferencia de materia interna. El módulo de Thiele para una cinética de Michaelis-Menten se calcula, de forma simplificada como aparece en la ecuación 7.13.

$$\phi = \frac{1}{a} \sqrt{\frac{V_{max}}{K_M \cdot D_{S,eff}}} \quad (\text{Ec.7.13.})$$

Siguiendo el trabajo publicado previamente por Chai et al. (2004), la difusividad efectiva dentro de las esferas depende de la concentración de alginato de la preparación. Estos autores obtuvieron un valor de  $6.2 \cdot 10^{-10} \text{ (m}^2 \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$  para esferas con una concentración de alginato de 2% en peso (semejante a la utilizada en la experimentación de este capítulo). Una vez conocido dicho dato, y conocido el radio de las esferas (la medición directa ofrecía valores alrededor de 2.5 cm), que permite calcular el área superficial de la transferencia ( $a$ ), se puede estimar el factor de eficacia interno, que, para una geometría esférica como ésta, se define en la ecuación 7.14.

$$\eta_i = \frac{3}{\phi} \left[ \frac{1}{\tanh(\phi)} - \frac{1}{\phi} \right] \quad (\text{Ec.7.14.})$$

Una vez que ambos parámetros han sido determinados, la concentración de sacarosa en la superficie de la esfera se puede calcular

siguiendo los siguientes parámetros adimensionales reflejados en las ecuaciones 7.15., 7.16., y 7.17.

$$C_S^* = \frac{C_{SS}}{C_{Sb}} \quad (\text{Ec.7.15.})$$

$$\beta = \frac{K_M}{C_{SS}} \quad (\text{Ec.7.16.})$$

$$\alpha = \eta_i \cdot Da + \beta - 1 \quad (\text{Ec.7.17.})$$

Todos estos parámetros adimensionales son relacionados en la ecuación 7.18. desde la que es posible estimar la concentración de sustrato en la superficie de las esferas.

$$C_S^* = \frac{-\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 + 4\beta}}{2} \quad (\text{Ec.7.18.})$$

Finalmente, el factor de eficacia externo se calcula como el cociente de la velocidad de reacción en el reactor heterogéneo y la velocidad de reacción en el homogéneo (Ecuación 7.19.).

$$\eta_e = \frac{r_{A(het)}}{r_{A(hom)}} = \frac{\frac{V_{max} \cdot C_{SS}}{K_M + C_{SS}}}{\frac{V_{max} \cdot C_{Sb}}{K_M + C_{Sb}}} = \frac{C_{SS}(K_M + C_{Sb})}{C_{Sb}(K_M + C_{SS})} \quad (\text{Ec.7.19.})$$

En este sistema heterogéneo, la catálisis ocurre porque el sustrato es capaz de difundir por el interior de los poros de las esferas de alginato. Por esta razón, se hace necesario realizar un balance de materia al interior del poro (ecuación 7.20.), que permite estimar la concentración del sustrato en cada punto del poro.

$$\frac{C_{Si}}{C_{Ss}} = \frac{1}{r^*} \left[ \frac{\sinh(\phi r^*)}{\sinh(\phi)} \right]; \quad r^* = \frac{r_{Av}}{r_p} \quad (\text{Ec.7.20.})$$

Se realizaron todos estos cálculos para cada una de las diferentes experiencias realizadas, tratando de identificar cuál de ellas ofrece unas mejores condiciones de operación para aminorar la resistencia a la transferencia de materia. En la Tabla 7.2. se muestran los resultados con los valores de cada uno de los experimentos, cuya codificación se especifica a continuación:

- Experimento A: caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.65
- Experimento B: caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.70
- Experimento C: caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.75
- Experimento D: caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.81
- Experimento E: caudal  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.65
- Experimento F: caudal  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.65
- Experimento G: caudal  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.65
- Experimento H: caudal  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y porosidad 0.65

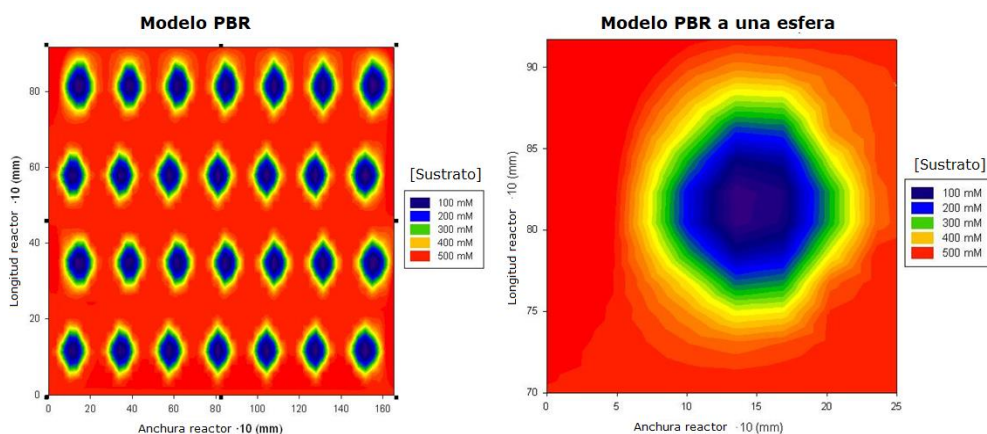
Los valores tomados para el cálculo de los parámetros de transferencia son los siguientes: la difusividad de la sacarosa se estima en  $6.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . La concentración de enzima en el reactor es estimada tomando un rendimiento de encapsulación del 75%, para una concentración de  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . La concentración de sustrato estimada en el centro de la partícula se hace en un punto muy próximo al centro de esta ( $r^* = 0.1$ ).

**Tabla 7.2. Valores del modelo de transferencia de materia para cada uno de los experimentos realizados con el reactor de lecho fijo.**

[illegible]

En dicha Tabla se observa que el factor de efectividad global no depende de las condiciones de operación (caudal) o de empaquetamiento del reactor (porosidad), puesto que la barrera más importante para un buen transporte de materia es la resistencia al transporte interno que ofrecen las esferas de alginato.

Con los valores obtenidos de la estimación de transferencia de materia, se realizó una representación de las concentraciones de sustrato en diferentes puntos del reactor, para comprender de mejor manera, cómo ocurre la transferencia de materia en el sistema. En la Figura 7.8. se muestran los diagramas de contorno, de sección longitudinal de la columna de lecho fijo, donde los colores representan las variaciones de concentración de sustrato en el sistema. En la figura de la izquierda se representa una amplia zona del reactor, mientras que en la derecha se muestra solamente el entorno de una de las esferas, donde se puede apreciar el gran gradiente de concentración que existe hacia el interior de la esfera, y que constituye la gran limitación para este sistema.



**Figura 7.8. Diagrama de contorno de las simulaciones de concentración de sustrato en el reactor de lecho fijo. Izquierda: reactor completo. Derecha: ampliación a una sola esfera.**

## 10.2. Transferencia de materia en reactor monolítico

Como se mencionó previamente, se realizó una simplificación de la estructura del monolito en canales paralelos y perpendiculares para facilitar el estudio de la transferencia de materia. Para explicar la transferencia externa, se utilizó la ecuación de Tronconi y Forzatti (1992) (ecuación 7.21.) para el cálculo del número de Sherwood; y desde éste, el cálculo del coeficiente de transferencia de materia ( $K_f$ ).

$$Sh = 3.657 + 8.827 \cdot \left(\frac{1000}{GZ}\right)^{-0.545} \cdot \exp\left(\frac{-48.2}{GZ}\right) \quad (\text{Ec.7.21.})$$

Los números adimensionales en este caso, tienen el mismo significado, pero sin embargo, dado que el sistema que se considera es diferente, la definición de los números es ligeramente distinta, referida sobre los canales del monolito. Estos números adimensionales se recogen en las ecuaciones 7.22., 7.23., 7.24., y 7.25.

$$Sh = \frac{K_f \cdot L_{ch}}{D_S} \quad (\text{Ec.7.22.})$$

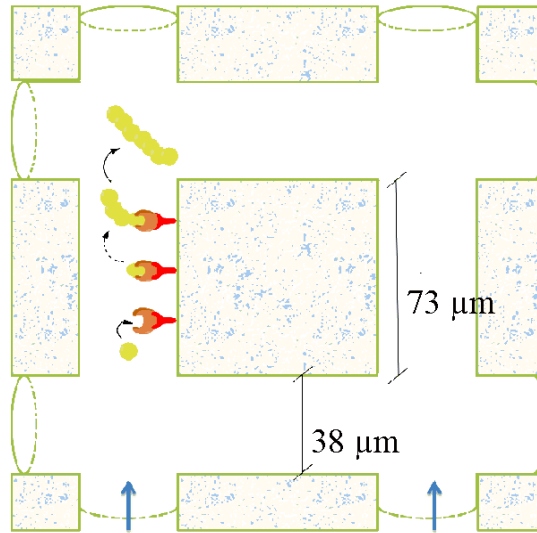
$$Re_{(ch)} = \frac{d_{ch} \cdot \rho \cdot v}{\mu_f} = \frac{d_{ch} \cdot \rho \cdot Q}{\mu_f \cdot A} \quad (\text{Ec.7.23.})$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D_S} \quad (\text{Ec.7.24.})$$

$$GZ = \frac{Re_{ch} \cdot Sc \cdot d_{ch}}{L_{ch}} \quad (\text{Ec.7.25.})$$

Para su cálculo, se toma la longitud promedio de un canal ( $L_{ch}$ ) igual que su anchura (distribución uniforme y paralela), con un valor de 68.1  $\mu\text{m}$ . La figura 7.9. explica la distribución de los poros de forma

paralela y perpendicular, y sintetiza también la forma en la que está ocurriendo la polimerización dentro de los canales.



**Figura 7.9. Simplificación del sistema de canales y de reacción del reactor monolítico.**

A continuación, para la valoración de la transferencia interna de materia, es necesario el cálculo del módulo de Thiele, que en esta ocasión será calculado utilizando la variación propuesta por Kalluri et al. (2009), para la transferencia interna en canales estrechos. Dicha simplificación considera una cinética de orden uno, y se enuncia según la ecuación 7.26.

$$\phi = b_{ch} \sqrt{\frac{Kr}{D_s}} \quad (\text{Ec.7.26.})$$

Sin embargo, como se ha visto previamente en este capítulo, las enzimas siguen una cinética de Michaelis-Menten, que no encaja con la

cinética de primer orden. A pesar de esto, y dado que las condiciones de operación serán siempre a velocidad máxima, se puede simplificar la ecuación de Michaelis-Menten, si se trabaja con una concentración del doble de la  $K_M$  (alrededor de  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_M + C_S} = \frac{V_{max} \cdot C_S}{3 \cdot K_M}$$

$$(si \ C_S \approx 2 \cdot K_M) \rightarrow Kr \approx \frac{V_{max}}{3 \cdot K_M} \quad (\text{Ec.7.27.})$$

Si se sustituye la expresión de  $Kr$  obtenida en la ecuación 7.27. por este término en la ecuación 7.26., es posible calcular el módulo de Thiele para el reactor monolítico. En este caso, dado que no tenemos un sistema tortuoso, pues se ha realizado una simplificación a canales paralelos, la difusividad no debe ser corregida como ocurrió en el reactor de lecho fijo. Una vez conocido el módulo de Thiele, es posible calcular el factor de eficacia interno, que, en este caso, para una superficie planar, se estima siguiendo la ecuación 7.28.

$$\eta_i = \frac{\tanh(\phi)}{\phi} \quad (\text{Ec.7.28.})$$

Una vez obtenido este valor, el resto del tratamiento de datos es semejante al presentado previamente en el reactor de lecho fijo. Mediante el uso de las ecuaciones 7.12. y 7.18. es posible calcular el número de Damköhler, y la concentración de sustrato en la superficie del soporte sólido.



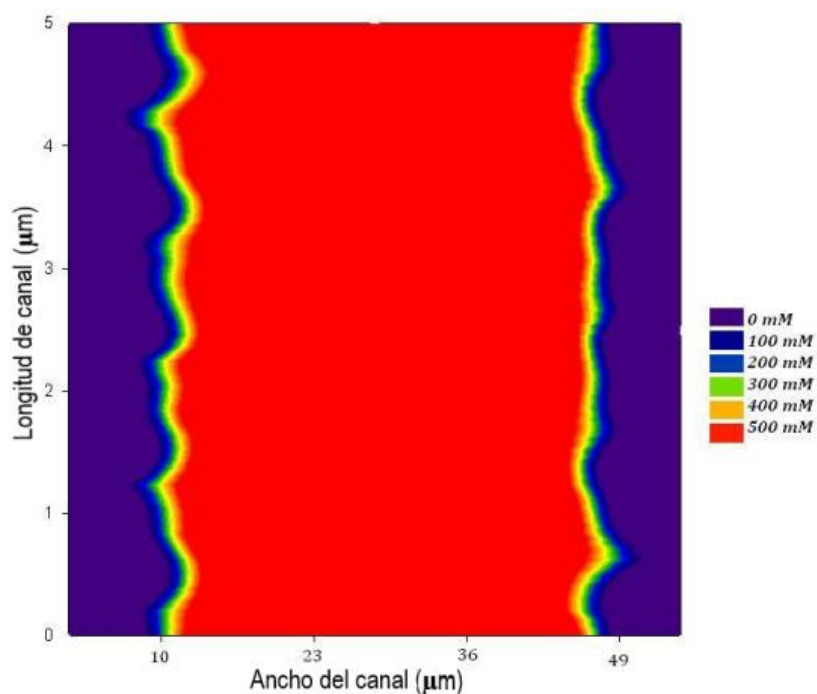
Del mismo modo que se realizó en el apartado anterior, para cada una de las condiciones de operación (caudal) y diseño del soporte (longitud del monolito), se calcularon los parámetros de transferencia de materia, y las concentraciones en las diferentes fases del sistema. En la Tabla 7.3. se resumen estos datos, y a continuación se detalla el código de experimento para comprender las condiciones que motivaron cada serie de resultados:

- Experimento A: longitud 2 cm y caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento B: longitud 3 cm y caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento C: longitud 5 cm y caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento D: longitud 7 cm y caudal  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento E: longitud 2 cm y caudal  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento F: longitud 2 cm y caudal  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento G: longitud 2 cm y caudal  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Experimento H: longitud 2 cm y caudal  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

**Tabla 7.3. Valores del modelo de transferencia de materia para cada uno de los experimentos realizados con el reactor monolítico.**

[illegible]

Con los valores obtenidos en función del espacio para el reactor monolítico, se esbozaron gráficos de contorno, donde se representa la sección longitudinal del monolito y en función de los colores, las concentraciones de sustrato. En este caso, en la figura 7.10. es posible apreciar la capa límite de la transferencia de materia, que se observa mucho más reducida que en el caso del reactor empaquetado.



**Figura 7.10. Diagrama de contorno de las simulaciones de concentración de sustrato en el reactor monolítico.**

## **11. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS PRODUCIDAS EN AMBOS REACTORES**

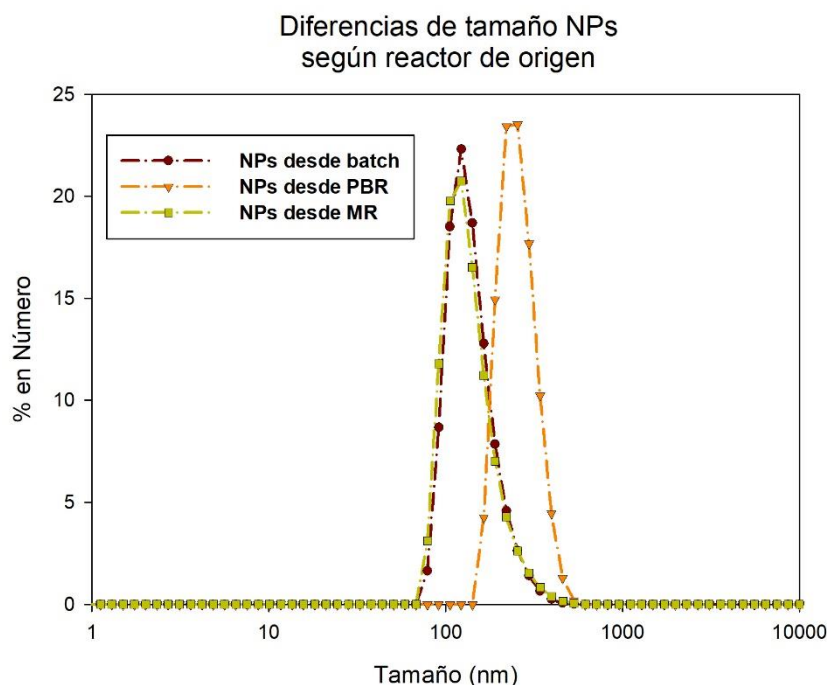
El fin último de estos diseños, es la producción de forma más rentable de un polímero que está destinado, principalmente, a la producción de nanopartículas. Sin embargo, las condiciones de producción y algunos impedimentos estéricos fruto de la inmovilización podrían condicionar el tamaño de las partículas.

Por esta razón, se procedió a la caracterización de las nanopartículas obtenidas desde el polímero de cada sistema, al dispersar en agua, a concentración de 1 mg/mL. Como ya se ha comentado en anteriores ocasiones, fruto de su carácter anfifílico, el polímero se reorganiza en el agua, y genera dichas nanopartículas. Se obtuvieron datos de tamaño de partícula y de carga superficial para cada uno de los casos, obtenidos por DLS, utilizando el equipo Malvern ZS Nano. Además del polímero recuperado en el tanque auxiliar, debido a los problemas difusionales, hay polímero que queda atrapado dentro de la esfera de alginato, que también se desea caracterizar. Para ello, es necesario desintegrar las esferas de alginato cuando la reacción ha terminado, y el reactor se ha vaciado.

Con tal fin, dichas esferas, que contienen el polímero, se dispersan en un tampón citrato (100 mM) durante 3 días. Para terminar con este período de incubación, la disolución es sonicada durante 10 minutos a 30°C (Ultrasound Starsoni 90, Liarre), seguida de agitación

vigorosa en vortex. De esta forma, las cápsulas de alginato son destruidas, y el polímero dispersado en la disolución tampón. Para retirar los restos de la ruptura, se procedió a centrifugar la muestra a 7000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804). El pellet está formado por los restos de las esferas de alginato destruidas, mientras que el polímero se encuentra en el sobrenadante. A partir de este punto, el sobrenadante se trata con etanol para precipitarlo, como ya se ha descrito previamente en este y otros capítulos (Jathore et al., 2012).

En la figura 7.11 se representa la distribución de tamaño de partícula para cada uno de los tres reactores previstos.



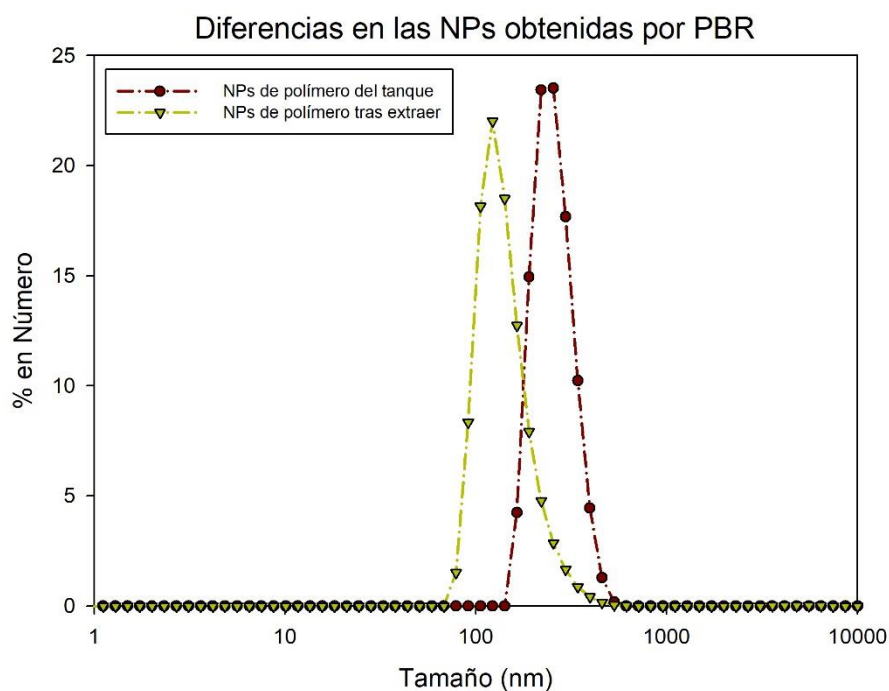
**Figura 7.11. Distribución de tamaño de partícula para las NPs producidas desde los tres tipos diferentes de reactores.**

Los resultados muestran que el tamaño medio de partícula es semejante en el reactor de tanque agitado (BSTR) y en el reactor monolítico (MR), situándose alrededor de 130 nm. Sin embargo, se observa un incremento significativo en las nanopartículas obtenidas desde el tanque auxiliar al reactor de lecho fijo, con un tamaño medio alrededor de 250 nm.

Sin embargo, se busca también conocer el tamaño que presentan las partículas obtenidas desde el polímero remanente en el soporte. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se obtuvo la distribución de tamaño de partícula que se muestra en la figura 6.12, junto a la distribución de tamaño de partícula obtenida por ese mismo reactor, pero en el tanque auxiliar. Como se puede observar, hay una diferencia notable en tamaño, siendo las partículas del polímero atrapado en el soporte significativamente menores en tamaño. Estas diferencias se podrían explicar por el entorno en el que ocurre la polimerización, que modificaría el peso molecular y ramificaciones del polímero, generando, como consecuencia, cambios en el tamaño. En todos los casos, el valor de la polidispersión (PDI) obtenido fue inferior a 0.1, y, por tanto, se concluye que existe una buena monodispersión de las partículas.

Finalmente, se determinó el potencial zeta mediante DLS de las diferentes partículas obtenidas, en función de su reactor de origen. No se apreciaron diferencias significativas entre las cargas superficiales de los diferentes sistemas (-2.40 mV para BSTR, -1.90 mV para MR, -1.26 mV para PBR). Estos resultados son concordantes con los presentados en capítulos previos, y la estabilidad de las partículas estaría garantizada

gracias al valor positivo del segundo coeficiente del virial del polímero en disolución.



**Figura 7.12.** Distribución de tamaño de las nanopartículas obtenidas en el reactor de lecho fijo, en el tanque, y tras extraer polímero del soporte.

## **12. ANÁLISIS ECONÓMICO DE LA RENTABILIDAD DE LA INMOVILIZACIÓN**

Para estimar la viabilidad del escalado de estos procesos a nivel industrial, se definieron los diagramas de flujo, y tras esto, se realizaron los balances de materia y energía oportunos utilizando los datos obtenidos experimentalmente. Posteriormente, se procedió al diseño de los equipos, y con esos datos, se pudo proceder a comparar ambos sistemas, y su rentabilidad.

El estudio económico se realizó estimando los precios de los equipos diseñados, y desde estos valores, por un método factorial, se fueron aplicando diferentes porcentajes para calcular otras partidas de la puesta en marcha y del funcionamiento de la planta. Se estima que esta forma aproximada de cálculo del rendimiento económico presenta un error máximo en el cálculo del 30%, que se puede considerar un error asumible teniendo en cuenta que no se trata de ser precisos, sino tan solo de una estimación sobre la rentabilidad de la inmovilización.

En ambos casos (reactor de lecho empaquetado y reactor monolítico), los cálculos de escalado se realizaron para una planta de producción de 500 kilogramos anuales. Se eligió esta cantidad dado que el producto que se maneja es considerado de alto valor añadido, y carecería de sentido plantear este estudio para la producción de cientos de toneladas anuales, puesto que no existiría demanda real para satisfacer las necesidades del mercado.



## **12.1. Diagramas de flujo**

En la figura 7.13. se representa el diagrama de flujo de la instalación con el reactor de lecho fijo, así como las corrientes y en la figura 7.14. se representa el diagrama de flujo de la instalación con el reactor monolítico, con sus respectivas corrientes.

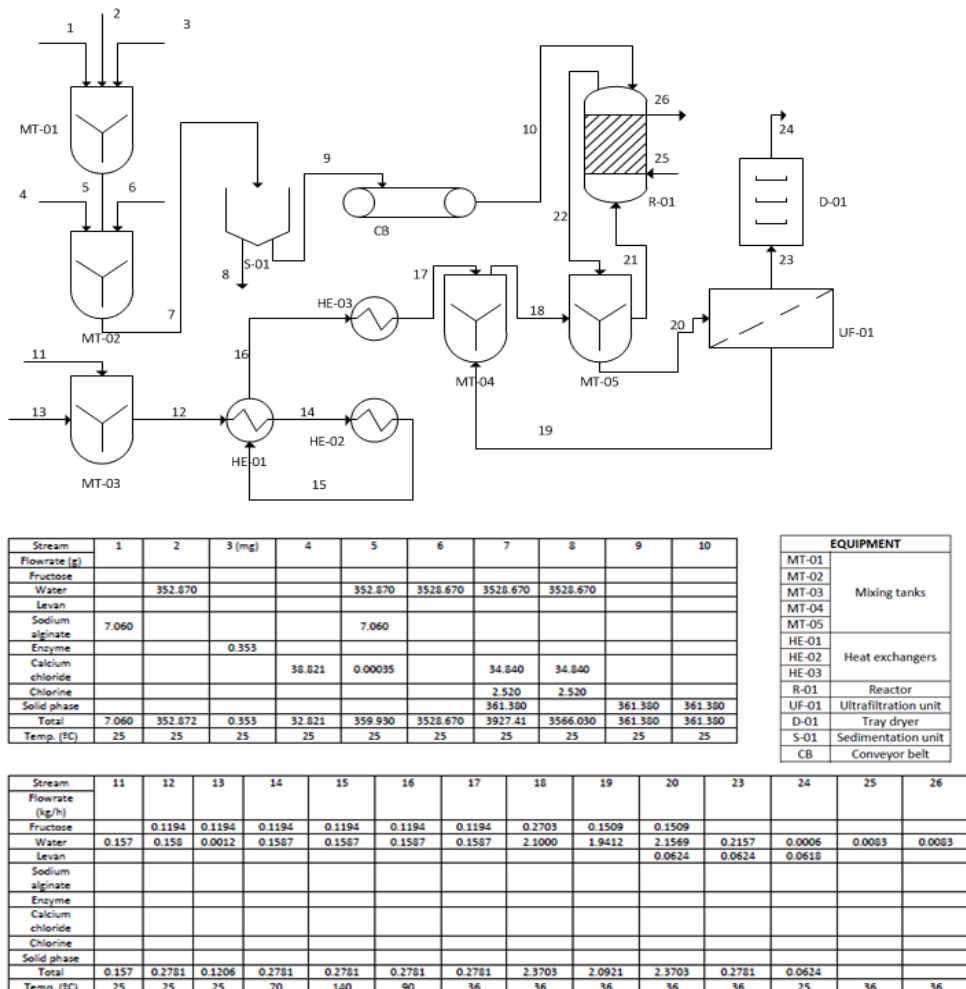
El proceso con la enzima en las esferas de alginato que se observa en la figura 7.13. se puede dividir en varios sectores: preparación de las esferas de alginato, esterilización, reacción y purificación del polímero.

En primer lugar, las esferas de alginato se producen de forma discontinua mediante el mezclado en un tanque de mezcla (MT-01) de alginato de sodio con agua desionizada hasta una concentración de 2% en peso. Cuando la disolución es completamente homogénea se dispersa sobre ella la enzima leván-sacarasa (concentración de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en un tanque diferente (MT-02) durante 30 minutos a 300 revoluciones por minuto. Esta mezcla se añade sobre 3.5 litros de una disolución de cloruro de calcio (concentración 0.1 M) para encapsular la enzima. Este paso termina con la obtención de las esferas por sedimentación seguido de un proceso de lavado en una cinta transportadora. Con las esferas de alginato ya sintetizadas, se introducen en el reactor que queda empaquetado según la porosidad deseada.

En otra región de la planta, pero de forma simultánea, la sacarosa se disuelve en agua en el tanque MT-03, y esta disolución es esterilizada

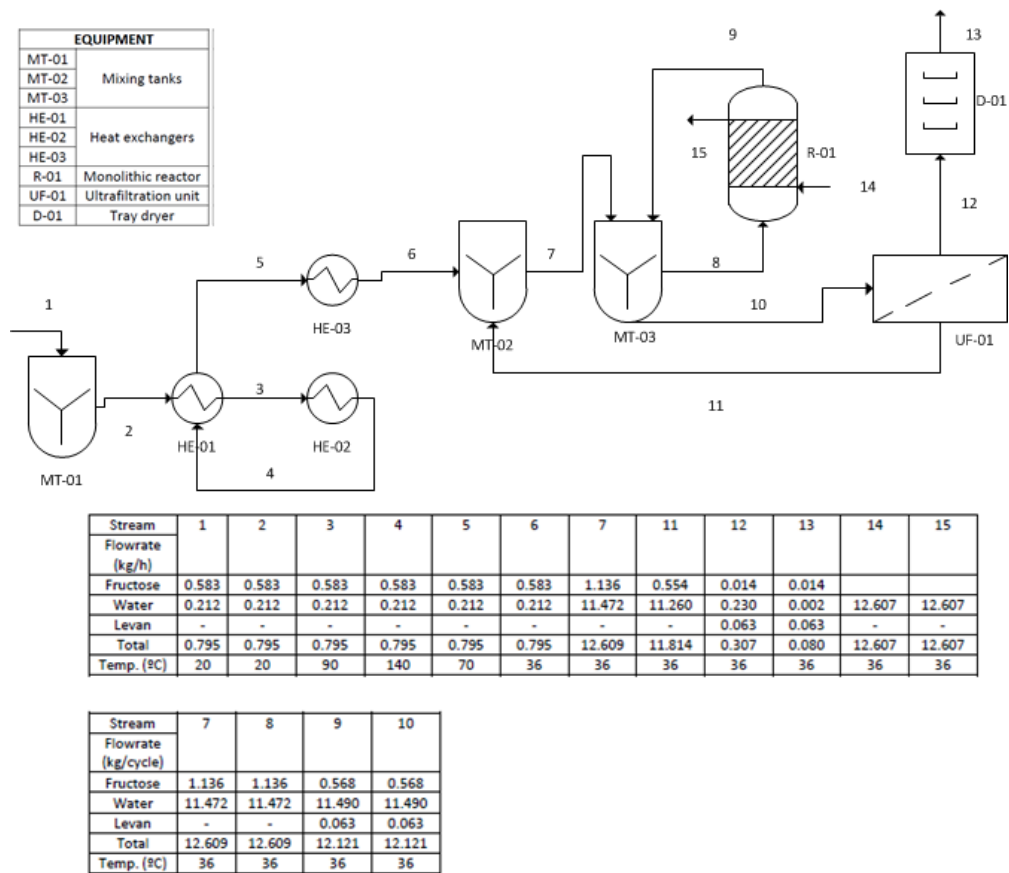
a través del paso por tres intercambiadores de calor, que se encuentran antes del tanque MT-04, donde la disolución de sustrato nuevo se mezcla con aquella que también contiene producto y viene de la recirculación del reactor R-01. Esta disolución mezclada en el tanque número 4 es introducida después en un tanque (MT-05) que contiene una disolución de sacarosa de  $110 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , que es el margen suficiente para que tras el continuo llenado del reactor se alcance la concentración de partida de  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esa disolución es bombeada al reactor y recirculada durante el tiempo que se estima para conseguir la reacción (alrededor de 20 minutos para que se haya hidrolizado toda la cantidad de sacarosa). En ese momento el tanque MT-05 es vaciado y se dirige la muestra hacia la zona de purificación. En este caso la composición de las corrientes número 21 y 22 no se incluyen en la figura porque las composiciones cambian con el paso del tiempo. Tras esto, el reactor es lavado con agua, y reemplazado por otro reactor para comenzar el proceso.

De cara a poder trabajar de forma continua es necesario que se dispongan de 5 reactores diferentes. Mientras uno está produciendo, otro se está cargando con las esferas de alginato, y otro está siendo limpiado. Los otros dos reactores se mantienen empaquetados para situaciones de emergencia si fuese preciso. Finalmente, el polímero producido va a ser recuperado por una membrana de ultrafiltración de tamaño de poro de 0.5 kDa (asegurando que la mayoría del polímero queda dentro de la corriente), y la sacarosa (menor de 500 Da) es recirculada hacia el tanque MT-04 para seguir siendo hidrolizada y polimerizada. Como última etapa, se utiliza un secador de bandejas para retirar la cantidad de agua que queda alrededor del polímero.



**Figura 7.13. Diagrama de flujo de una planta con un reactor de lecho fijo para la producción de leván.**

El proceso con el reactor monolítico (figura 7.14.) tiene una sección previa donde el soporte es preparado, activado y cargado con cobre. Estos soportes una vez preparados han de conservarse a -18°C hasta ser utilizados. Para este proceso, se pueden observar en el diagrama de flujo las siguientes secciones: esterilización y purificación que operan de forma continua, y reacción que opera de forma discontinua.



**Figura 7.14. Diagrama de flujo de una planta con un reactor monolítico para la producción de levan.**

El proceso comienza con un tanque agitado que se encarga de la mezcla de sacarosa con agua a 20°C (MT-01). La mezcla será esterilizada con dos intercambiadores de calor y tras eso es enfriada hasta 36°C que es la temperatura de operación. Esta mezcla es introducida seguidamente en otro tanque de mezclado (MT-02) donde se mezcla con el sustrato no utilizado y recirculado. Cuando el tanque MT-03 se llena (una hora), se descarga sobre la zona de reacción (comienza el trabajo en discontinuo), donde se produce la transformación enzimática. La concentración óptima

de trabajo son  $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  que generan una conversión a polímero del 5.5% en el tiempo que dura la reacción. Ese valor ha sido seleccionado atendiendo al balance entre: sustrato usado y conversión alcanzada; obtenido por los resultados experimentales previamente presentados. Mientras un reactor se encuentra en operación el otro se encuentra en proceso de limpiado; y por este motivo, son necesarios dos reactores más (para que se vaya produciendo la inmovilización de enzima cada 14 días de acuerdo con los estudios de estabilidad, y para las emergencias que pudiesen ocurrir). De la misma forma que en el otro sistema, el producto es posteriormente purificado por ultrafiltración, permitiendo la recirculación del sustrato no catalizado al MT-02; y tras esto, puede ser secado en un secador de bandejas.

## **12.2. Valoración económica**

Para poder realizar una comparación económica adecuada entre el reactor monolítico y el reactor de lecho fijo, es necesario diseñar, de acuerdo con los balances de materia y energía, los diferentes equipos, y con ello, evaluar el coste de implantar dichos equipos en una planta. Para estimar el precio de los equipos se utilizó la herramienta MATCHE ([www.matche.com](http://www.matche.com)), que es un destino web que realiza estimaciones del coste de los equipos dependiendo de sus medidas y geometrías.

Debido a la baja capacidad de producción estimada para la planta (solamente 500 kg por año), cada intercambiador de calor se diseñó como un intercambiador de doble-tubo, dado el escaso área de intercambio

necesario ( $0.5 \text{ m}^2$ ). Este valor fue el seleccionado para la estimación del coste.

Los tanques de mezclado se diseñaron utilizando los datos de tiempo de residencia y caudal obtenidos del desarrollo experimental. Se consideró que la altura debería ser el doble del diámetro, y siendo el fondo del tanque de forma elipsoidal. Los tanques de almacenaje se diseñaron siguiendo las consideraciones de API-ASME, donde el volumen de cada tanque se estableció en el límite inferior de acuerdo con dichas reglas (250 litros). Los equipos de ultrafiltración y secadores de bandejas se diseñaron atendiendo a los caudales que debían tratar. Concretamente, el precio del equipo de ultrafiltración se estimó siguiendo las recomendaciones de Sethi y Wiesner (2000).

Cuando se ha estimado el precio de los equipos principales, el coste del capital fijo, y los costes de producción se estimaron por el método factorial (Coulson y Richardson, 2005), que asegura desviaciones de cálculo inferiores al 30%. Los resultados se pueden observar en las tablas 7.4. y 7.5.

**Tabla 7.4. Estimación de costes de Capital fijo para ambas plantas.**

Concepto	Planta reactor lecho fijo (€2017)	Planta reactor monolítico (€2017)
Equipos principales (f1)	14000	125,000
Levantamiento de equipos (f2) = 0.40*f1	55,000	50,000
Red de tuberías (f3) = 0.70*f1	95,000	85,000
Instrumentación (f4) = 0.20*f1	27000	25,000
Red eléctrica (f5) = 0.10*f1	14,000	10,000
Edificio de proceso (f6) = 0.15*f1	21,000	20,000
Coste físico de la planta (1- 6) = f7	350,000	315,000
Diseño e ingeniería (f8) = 0.30*f7	105,000	95,000
Tasa del contratista (f9) = 0.05*f7	17,000	15,000
Contingencias (f10) = 0.10*f7	35,000	30,000
<b>TOTAL CAPITAL FIJO (FC)</b>	<b>500,000</b>	<b>460,000</b>

La tabla 7.4. muestra que el coste del capital fijo es un poco superior en la planta con reactor de lecho fijo, porque el coste de los

equipos es mayor en este tipo de planta, a pesar de que el coste del reactor es mayor en el caso de la planta con reactor monolítico (75,000€ frente a 30,000€). Sin embargo, la producción de esferas de alginato necesita mayor equipamiento. La diferencia no es realmente significativa a nivel de capital fijo entre ambas plantas.

Los costes de producción son fácilmente estimables desde el coste del capital fijo, por un método factorial de la misma forma. El coste de las materias primas se calcula a partir de los balances de materia y energía, y el coste del personal atendiendo a los equipos y a los turnos necesarios (Vián Ortuño, 1991). Finalmente, el coste de los servicios se calculó como el 10% del coste de las materias primas (Molina Grima et al., 2003). Este porcentaje es muy conservador si se compara con el 5% utilizado en otras industrias biotecnológicas. En la tabla 7.5. se muestran los resultados de los costes de operación, que ascienden a 2,800,000€ por año en el caso de la planta con reactor de lecho fijo, y a 2,900,000€ por año para la planta con reactor monolítico. Los costes son semejantes, pero ligeramente superiores para la planta con reactor monolítico, debido al mayor coste de las materias primas en la preparación del monolito.

Tomando en consideración el volumen de producción (500 kg/año), el coste de producción anual sería de 5,600€/kg para la planta con reactor de lecho fijo, y de 5,800€/kg para la planta con el reactor monolítico.



**Tabla 7.5. Estimación de los costes anuales de producción  
para ambos tipos de plantas.**

<b>Concepto</b>	<b>Planta reactor de lecho fijo (€2017/año)</b>	<b>Planta de reactor monolítico (€2017/año)</b>
Materias primas (1)	300,000	400,000
Otros materiales variados (2) = $0.10 \cdot (4)$	5,100	4,600
Servicios (3) = $0.10 \cdot (1)$	30,000	40,000
<b>COSTES variables (A) = <math>(1+2+3)</math></b>	<b>335,000</b>	<b>446,000</b>
Mantenimiento (4) = $0.10 \cdot FC$	50,000	46,000
Costes de operación (5)	1,000,000	1,000,000
Costes de laboratorio (6) = $0.20 \cdot 6$	200,000	200,000
Supervisión (7) = $0.20 \cdot 6$	200,000	200,000
Gastos generales de la planta (8) = $0.10 \cdot FC$	500,000	500,000
Cargos de capital (9) = $0.10 \cdot FC$	50,000	46,000
Seguros (10) = $0.01 \cdot FC$	5,000	4,600
Impuestos locales (11) = $0.02 \cdot FC$	10,000	9,000
Royalties (12) = $0.01 \cdot FC$	5,000	4,600
<b>Costes fijos (B) = <math>4+5+6+7+8+9+10+11+12</math></b>	<b>2,000,000</b>	<b>2,000,000</b>
<b>Costes relacionados con la producción (C) = A+B</b>	<b>2,335,000</b>	<b>2,445,000</b>
Gastos de ventas, investigación y desarrollo (13) = $0.20 \cdot C$	470,000	490,000
<b>Costes anuales de producción = <math>C + (13)</math></b>	<b>2,800,000</b>	<b>2,900,000</b>

En el caso de la **enzima libre**, el coste se vería incrementado considerablemente, si lo comparamos con estos dos sistemas. Considerando un 20% de conversión (g polímero/g sustrato) a las 24

horas, operando a la concentración óptima (90 g/L) y la necesidad de tener una concentración de 0.2 ppm en el tanque de reacción, se necesitan al menos 8 litros de reactor operando para alcanzar una producción equivalente (500 kg/año), lo que implica una cantidad de enzima gastada diariamente de 1.6 mg. Por tanto, considerando 330 días de operación, y el precio de la enzima purificada (200€/mg), solamente el coste de la enzima como materia prima supera los 100,000€, lo que repercute en un incremento del 25% solamente en el coste de las materias primas.

Queda por tanto demostrada, que la producción con la enzima inmovilizada resulta de interés para reducir los costes de operación, sin comprometer las características del polímero obtenido posteriormente. Con estos sistemas, el coste de producción se estima entre 5 y 6€ por gramo producido, lo que favorecería su comercialización, comparada con el precio de mercado, que alcanza los 200 € (levan desde *E. herbicola*, en Sigma-Aldrich).

### **13. CONCLUSIONES**

En este capítulo se ha resumido el proceso de inmovilización llevado a cabo en dos tipos de soportes diferentes (esferas de alginato y monolito superporoso de agarosa). Como se ha demostrado, se han conseguido grandes rendimientos de inmovilización sin comprometer la actividad enzimática. Además, se ha estudiado la influencia de ciertos parámetros (porosidad, longitud, caudal) en la catálisis enzimática de cara a poder planificar un escalado del proceso a volúmenes superiores.

Se estudió también la estabilidad de la enzima en el soporte, así como la recuperación de la enzima desde el soporte monolítico por un proceso de elución. Se comprobó que el polímero obtenido es capaz de formar nanopartículas en agua, y que existen diferencias en tamaño según el reactor obtenido, lo que permitiría caminar hacia un diseño de nanopartículas a la carta.

Finalmente, se determinaron los parámetros de un modelo de transferencia de materia planificado para explicar ambos fenómenos, y se realizaron cálculos sobre la eficacia de la inmovilización para la reducción de costes de producción de polifrutosa, en comparación con la enzima libre en un reactor de tanque agitado.

---

**Artículo publicado relacionado con el capítulo:**

Biotechnological strategies to produce leván: Mass transfer and technological evaluation. Chemical Engineering and Processing 141 (2019), 107529.



# **Capítulo 8**

---

## **Aplicaciones biomédicas de levan**



## **1. INTRODUCCIÓN**

Como se ha comentado en la introducción de la tesis doctoral, las moléculas de polifruktosa presentan unas propiedades físicas y químicas, que las hacen ideales para emplearse en un sinfín de aplicaciones. Durante los capítulos 4 y 5 se ha descrito la caracterización de las nanopartículas producidas de forma microbiana y de forma enzimática, como posibles sistemas transportadores de fármacos. Sin embargo, solamente se consideró en las caracterizaciones las partículas vacías, sin estudiar la capacidad de carga de fármacos, o su comportamiento y eficacia terapéutica. A lo largo de este capítulo se van a describir y validar tres potenciales aplicaciones de estas nanopartículas.

En primer lugar, se buscará utilizar el polímero levan como un sistema de transporte de un fármaco de amplio uso en quimioterapia, el 5-fluorouracilo. Se estudiará su capacidad de carga, así como el tamaño y la carga de las nuevas partículas una vez incorporado el fármaco en el vehículo. En este apartado se analizará también su efecto en líneas celulares, estudiando su efecto de control de la proliferación celular. Este estudio se llevará a cabo comparando la acción del fármaco en forma libre y retenido en las nanopartículas de levan.

Como segunda aplicación, se estudiará la posibilidad de usar la polifruktosa para generar partículas con plata que puedan funcionar como controladoras de la población bacteriana. Posteriormente, se

incluirán esas partículas en un gel de alginato, para analizar la posibilidad de crear un soporte que controle la población bacteriana, al liberar las partículas desde dicho gel. Este proceso será modelado utilizando software informático para predecir los parámetros de supervivencia y liberación de las partículas del gel.

Finalmente, se estudiará el recubrimiento de prótesis de titanio-aluminio-vanadio con polifruetosa, previniendo la contaminación bacteriana de la prótesis, con gran aplicación potencial en el campo de la traumatología. Concretamente, se abordará el proceso de recubrimiento, se caracterizará de forma química y por microscopía electrónica; y se analizará su viabilidad y aplicación al estudiar la adhesión bacteriana a las prótesis recubiertas.



## **2. USO COMO SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS**

Los sistemas de liberación controlada de fármacos ofrecen ventajas frente a la liberación del fármaco libre. En la introducción (capítulo 1) se han presentado las principales ventajas, así como algunos trabajos previos que han explorado esta opción con polifruktosa, para el transporte de diferentes sustancias en las nanopartículas que forman al reorganizarse en agua.

El 5-fluorouracilo es una pirimidina fluorinada, y uno de los fármacos más habituales para el tratamiento del cáncer. Particularmente, se ha visto efectivo en detener la proliferación de los siguientes tumores: mama, cabeza y cuello, colon, estómago, y algunos tipos de tumores de piel. Se engloba dentro de los fármacos quimioterápicos conocidos como anti-metabolitos. Estos compuestos son semejantes a moléculas propias del cuerpo, pero con una diferencia en su estructura.

Específicamente, esta molécula se une a la enzima timidilato sintetasa, inhibiendo su acción, y afectando a la síntesis de DNA y RNA (Longley et al., 2003). Este fármaco es parcialmente hidrofóbico, dado que su máxima solubilidad en agua se estima inferior a 1 mg/mL. Es por esto, que se busca incorporar en soportes o transportadores que generen una mejor biodistribución sistémica de la sustancia (Liu et al., 2011).

Las nanopartículas presentadas anteriormente, ensambladas para ofrecer mejor contacto con el agua, dejan en su interior una cavidad hidrofóbica, que podrá ser usada por el fármaco para incluirse en ella, y tener un mejor transporte cuando sea administrado en el torrente sanguíneo (medio polar).

Por tanto, el principal objetivo de esta sección es el estudio de la retención de este fármaco en las nanopartículas de *levan*, estudiando su capacidad de carga, así como el efecto que produce sobre dos líneas celulares (cáncer de mama y cáncer de colon), comparando la eficacia del tratamiento en forma libre y en forma encapsulada.

## **2.1. Adsorción de 5-fluorouracilo**

Debido a la electronegatividad del ion flúor, éste es capaz de retenerse mediante interacciones electrostáticas, que son más fácilmente reversibles para una correcta liberación posterior. Por esta razón, se exploró la alternativa de la adsorción al polímero como la forma más viable de la retención del fármaco.

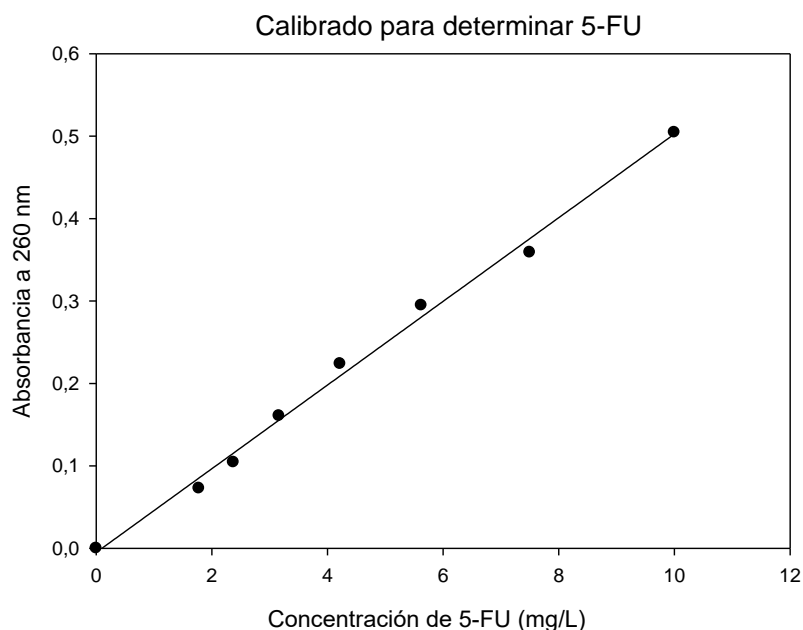
Se procedió a estudiar la adsorción de esta molécula en nanopartículas de polifruetosa, y cuantificar la capacidad de carga de las mismas, así como las variaciones en la forma, tamaño o carga superficial de las nanopartículas cuando contienen el fármaco. Se

realizaron los experimentos tanto con el polímero obtenido de forma microbiana, como de forma enzimática.

Primeramente, se preparó una disolución acetona:agua (proporción 20:80 %v/v), donde se disolvió 5-fluorouracilo a concentración de  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (la adición de acetona supone un aumento de la solubilidad del compuesto), y se dejó mezclando durante 2 horas. Posteriormente, se añadió polímero, a concentración  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y se mantuvo durante dos días con agitación orbital para conseguir la adsorción del fármaco en las nanopartículas.

Al finalizar el proceso, se sometió a un proceso de diálisis, utilizando membranas con un límite de peso molecular de 500 Da (permiten la salida del fármaco, con peso molecular 130 Da, pero no del polímero). Se mantuvo la diálisis durante al menos 4 días, con cambio de agua cada 24 horas. Como última etapa, el interior de la bolsa se analiza por espectrofotometría a 260 nm, para calcular la cantidad de 5-fluorouracilo.

Para poder cuantificar adecuadamente el fármaco, es necesario realizar un calibrado con concentraciones conocidas a 260 nm, utilizando un espectrofotómetro ultravioleta y visible (UV-1800, Shimadzu). El resultado de dicho calibrado se muestra en la figura 8.1.



**Figura 8.1. Calibrado para la determinación de 5-FU por espectrofotometría de UV a 260 nm.**

De la regresión de los datos experimentales se obtiene la ecuación (ecuación 8.1) que permite relacionar absorbancia (A) y concentración (C), que se corresponden, con el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la ley de Lambert-Beer. El valor de la regresión obtenido es muy elevado ( $R^2 = 0.994$ ), indicando la buena capacidad analítica del calibrado.

$$A = 0.0499 \cdot C_{5FU} \quad (\text{Ec. 8.1.})$$

En esta ecuación, la absorbancia viene expresada en u.a. y la concentración en mg/L (ppm). El valor del coeficiente de extinción

molar obtenido es muy semejante a otros obtenidos previamente en la bibliografía (Liu y Zhang, 2011).

Al estudiar la concentración en el interior de la bolsa de diálisis, se obtuvieron las concentraciones de fármaco para los dos polímeros diferentemente obtenidos, y se procedió a calcular la capacidad de carga de las partículas, que se define como en la ecuación 8.2.

$$\text{Capacidad carga (\%)} = \frac{\text{masa fármaco}}{\text{masa polímero}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 8.2.})$$

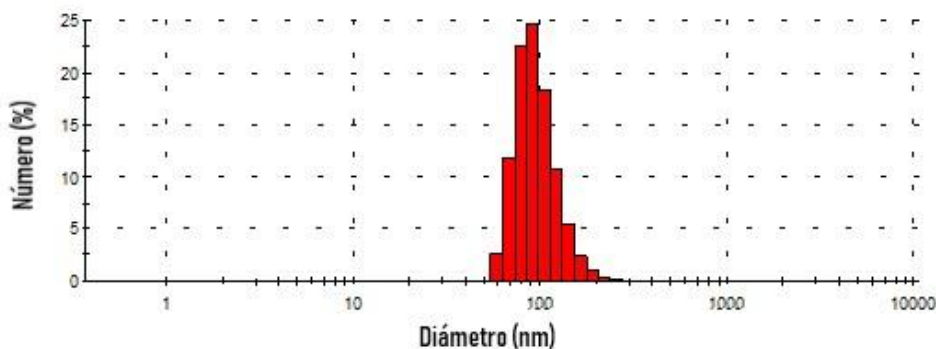
Conocidas las concentraciones de fármaco y polímero, se obtuvo una capacidad de carga de 0.71% para el caso de la obtención microbiana y del 0.60% para el caso de la obtención por vía enzimática.

Atendiendo al rendimiento de la retención, es decir, cuánto ha sido retenido sobre la cantidad inicialmente aportada, los valores superan el 90% en ambos casos.

Estos valores de capacidad de carga son semejantes a otros obtenidos previamente en la bibliografía para otro tipo de nanopartículas, en el que no se cristaliza el fármaco como paso previo a la inclusión. Así, Pieper et al. (2018) obtuvieron una capacidad de carga de 0.51% al encapsular doxorrubicina en partículas de PLGA-PEG, o Thauvin et al. (2018) que consiguieron capacidades de carga entre 0.4% y 1.3% para diferentes tipos de partículas basadas en PLA.

Con la capacidad de carga, y sabiendo que la dosis letal 50 (DL50), para la línea celular de cáncer de colon (HCT-116) es de 6  $\mu\text{M}$  (Bracht et al., 2010), se puede estimar la concentración de partículas a suministrar para alcanzar dicha dosis. En este caso, el valor se sitúa entre 0.10 y 0.12 mg/mL.

Debido a la facilidad para la síntesis del levan obtenido de forma enzimática, el resto de caracterizaciones y experimentos fueron realizados con este compuesto. Una vez incorporado el fármaco, se estudiaron las modificaciones en el tamaño de partícula tras la incorporación del fármaco, utilizando DLS, como se ha descrito anteriormente en otros capítulos. En la figura 8.2 se representa la nueva distribución de tamaño de partícula al añadir 5-FU a las partículas obtenidas utilizando la reacción enzimática.

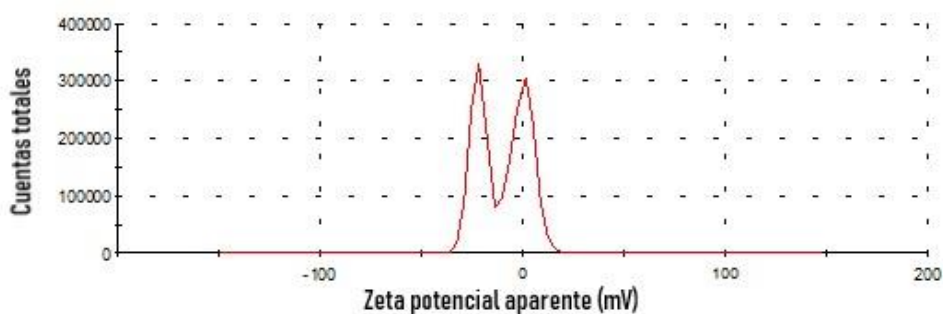


**Figura 8.2. Distribución de tamaño de partícula para nanopartículas de levan funcionalizadas con 5-FU.**

Como se observa en la figura 8.2, el tamaño de partícula es muy semejante al obtenido con las nanopartículas sin cargar fármaco, en el entorno de 100 nm. Este resultado sugiere que la adición de fármaco (5-

FU) no condiciona el proceso de auto-ensamblado y tampoco influye sobre la organización de las cadenas.

También se estudió el potencial zeta para las nanopartículas obtenidas de forma enzimática y funcionalizadas con el fármaco 5-fluorouracilo. En la figura 8.3 está representada la distribución de cargas superficiales en estas nanopartículas. Se pueden apreciar claramente dos picos diferentes, uno de ellos se corresponde con el pico tradicional de las nanopartículas de levan (ver capítulo 5), alrededor de la neutralidad de carga (0 mV). Sin embargo, al cargar las nanopartículas con 5-FU se observa que alrededor de la mitad de las nanopartículas se encuentran notablemente cargadas (-22 mV como promedio). Este incremento en la carga superficial se debe a la presencia del átomo electronegativo de flúor presente en 5-FU. Este incremento en la carga absoluta de las nanopartículas garantiza más estabilidad, y, por tanto, garantía de no agregación durante la administración sistémica de las mismas.



**Figura 8.3. Distribución de carga superficial para nanopartículas de levan funcionalizadas con 5-FU.**

## 2.2. Ensayos *in vitro* en líneas celulares

Las nanopartículas cargadas con 5-FU fueron evaluadas como posibles sistemas de liberación controlada de fármacos mediante cultivos *in vitro*, utilizando líneas celulares de cáncer de colon (línea HCT-116) y de cáncer de mama HER 2+ (línea BT474). El fármaco 5-FU se ha visto más eficaz en el tratamiento de carcinoma de colon y de hecho, es uno de los tratamientos actuales de esta patología (Bracht et al., 2010).

Para llevar a cabo los experimentos *in vitro* se emplearon placas multipocillo de 1 mL cada una. Se cargan inicialmente 8,000 células por pocillo y por mL de medio. El medio empleado es DMEM (Medio mínimo esencial de Eagle). El estudio se prolonga durante 72 horas después de la adición de las nanopartículas.

La viabilidad celular se calcula mediante el ensayo MTT, donde se toman medidas cada 24 horas para cada línea celular. Se utilizan tantas placas como medidas y líneas, ya que una vez medida una placa ésta se debe desechar. El ensayo MTT se basa en la capacidad de este reactivo de penetrar el citoplasma celular e interferir en el metabolismo de las células vivas, formando cristales de formazán, que pueden seguirse por espectrofotometría a 550 nm (Mosmann, 1983).

Concretamente, para la realización de este ensayo se añaden 110 µL de reactivo MTT a cada pocillo y se dejan reaccionar durante 1 hora a 37°C. Las células quedan lisadas en el pocillo, y los cristales de formazán se depositan en el fondo del pocillo. Se retira el medio y se



añaden 0.5 mL de DMSO a cada pocillo, que va a disolver los cristales, produciendo un color violeta que es el que se observa en el lector de placas a 550 nm. Desde la absorbancia se puede estimar la viabilidad del cultivo en cada momento.

El día que comienza el experimento (tiempo -24 horas) se siembran las células en todas las placas y se mantiene durante un día para que ocurra el asentamiento de las células a la placa (fase de latencia del crecimiento). Tras esto, a tiempo 0 horas, se añaden en los pocillos correspondientes, las concentraciones de nanopartículas y fármaco libre que se deseen ensayar, dejando siempre pocillos que servirán como control de medio de cultivo, control de nanopartículas solas (no cargadas) y control de crecimiento de células (aquellos en los que no se administra ni fármaco ni nanopartículas cargadas). Desde este momento, se toman medidas de MTT cada 24 horas (24, 48 y 72 horas), para calcular la viabilidad celular.

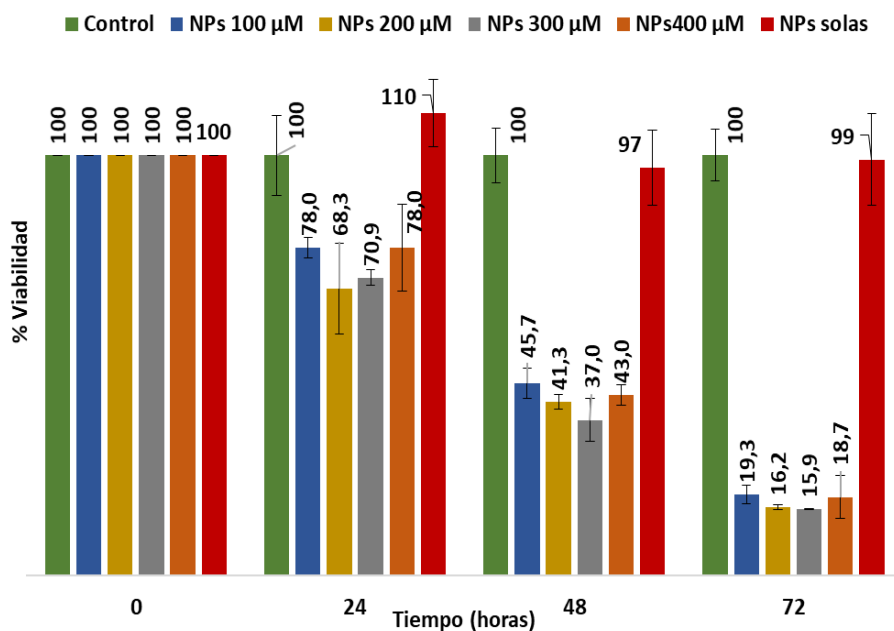
La viabilidad celular se calcula como un porcentaje, es decir, la concentración de células de la muestra en cuestión, relativizada con la concentración de células en el control (crecimiento libre de células, sin fármaco). La ecuación empleada para calcularlo se resume en la ecuación 8.3.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{[Abs(muestra) - Abs(medio)]}{[Abs(control) - Abs(medio)]} \cdot 100 \quad (\text{Ec 8.3.})$$

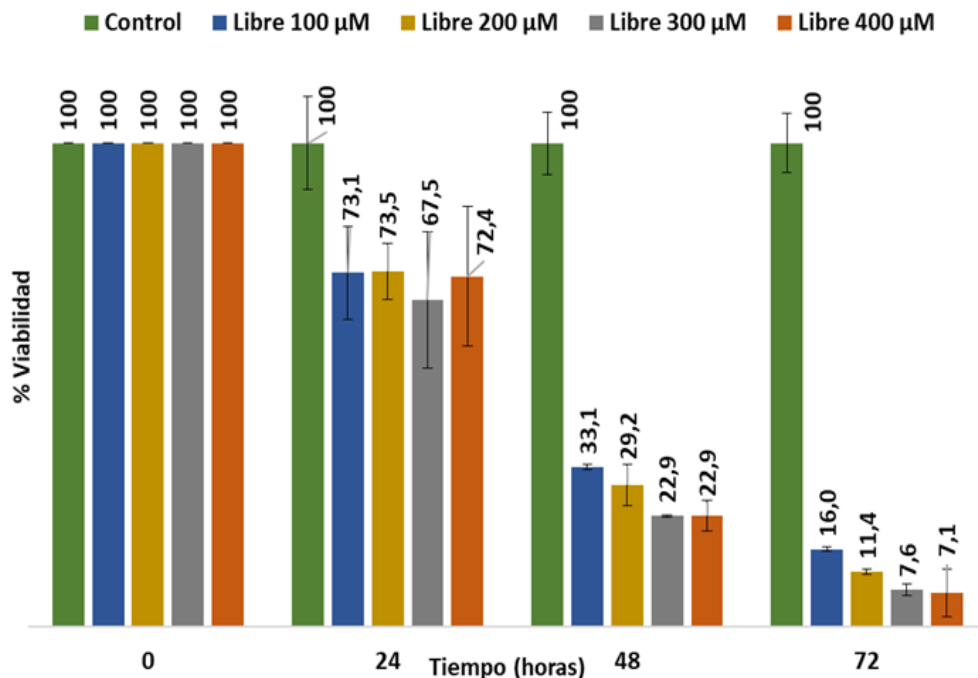
Como puede observarse, dado que se trata de valores relativos (porcentajes), no es necesario transformar la absorbancia en valores de concentración de células mediante un calibrado.

Específicamente, en los ensayos *in vitro* realizados en este apartado, se emplearon dos líneas celulares, en las que se ensayaron cuatro concentraciones de fármaco en las nanopartículas (100, 200, 300 y 400  $\mu\text{M}$ ), y las mismas cuatro concentraciones de fármaco en forma libre (100, 200, 300 y 400  $\mu\text{M}$ ); para poder valorar la eficacia del tratamiento a emplear. De igual forma, se estudió el efecto que tiene sobre el crecimiento la administración de las nanopartículas vacías (sin fármaco), a una concentración de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se seleccionaron estas concentraciones atendiendo a la dosis letal 50 (la que causa la muerte del 50% de las células) ya reportada para el fármaco 5-FU por Bracht et al. (2010).

Para el caso de la línea celular BT-474, los resultados de viabilidad alcanzados se muestran en las figuras 8.4 y 8.5 (fármaco contenido en nanopartículas y en forma libre respectivamente).



**Figura 8.4. Resultados *in vitro* de viabilidad celular en la línea BT474. Efecto del fármaco contenido en nanopartículas.**

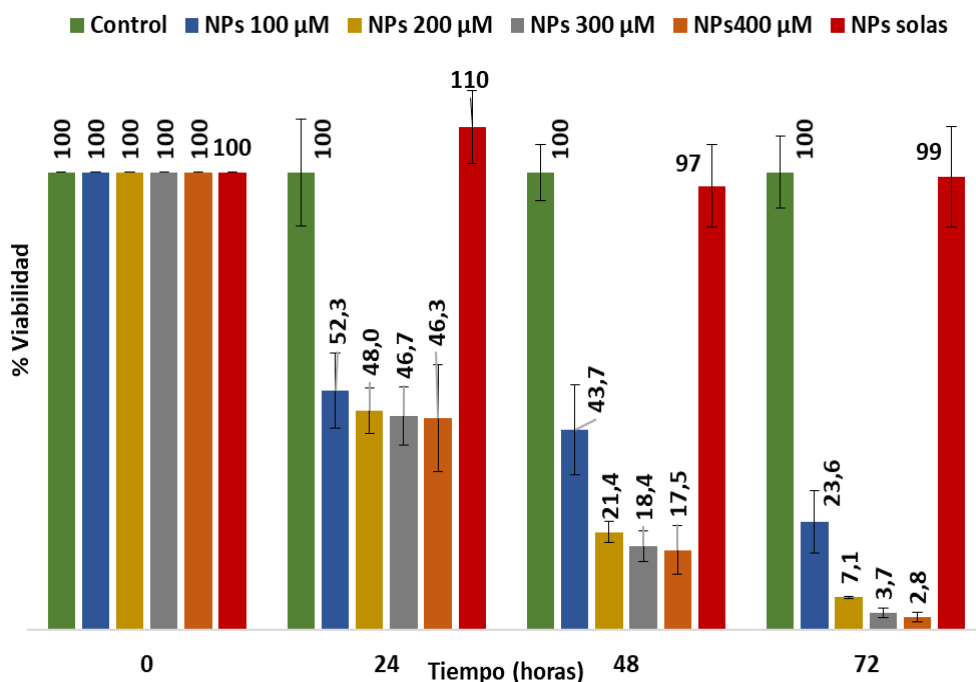


**Figura 8.5. Resultados *in vitro* de viabilidad celular en la línea BT474. Efecto del fármaco en forma libre.**

En las dos figuras anteriores (8.4 y 8.5) se puede apreciar cómo el tratamiento resulta efectivo en ambos casos, siendo mucho más agresivo cuando se administra en forma libre, donde la viabilidad se sitúa por debajo del 10% en las dosis más altas a 72 horas. No se observan diferencias significativas en las primeras 24 horas ni entre las concentraciones ensayadas, ni según la forma de administración. Es decir, la liberación ocurre de forma semejante en los primeros tiempos para todas las concentraciones, y es este fenómeno el que controla la viabilidad. Sin embargo, sí se observan diferencias a 48 horas, donde la viabilidad en el caso del fármaco libre se reduce por debajo del 30% mientras que, en el caso del fármaco encapsulado, aún se sitúa en el entorno del 40%. De esta forma queda probada la consecución de un sistema de liberación controlada de fármacos, que permite administrar

la dosis de una forma más sostenida, alargando los tiempos entre tratamientos. De igual forma, se observa que las nanopartículas por sí mismas carecen de efecto terapéutico, siendo compatibles con el crecimiento celular, sin resultar tóxicas.

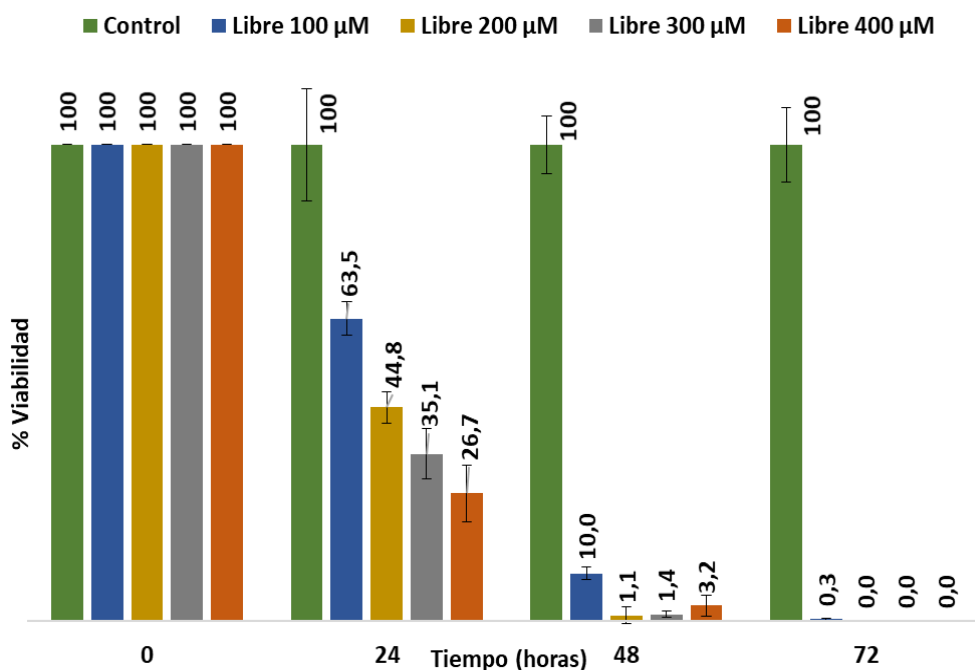
En las figuras 8.6 y 8.7 se representan los resultados correspondientes a la línea celular de cáncer de colon (HCT116) para ambas formas de tratamiento (fármaco contenido en nanopartículas y en forma libre respectivamente).



**Figura 8.6. Resultados *in vitro* de viabilidad celular en la línea HCT116. Efecto del fármaco contenido en nanopartículas.**

Como se puede observar en la figura 8.6, la reducción de la viabilidad es más acusada en cáncer de colon que en cáncer de mama, donde se reduce la viabilidad en las concentraciones más altas hasta el

3% a las 72 horas. Para el caso de la concentración más baja se observa un comportamiento semejante al de cáncer de mama, de tal forma que parece que, en las concentraciones más bajas, la acción terapéutica está controlada por la liberación controlada del fármaco.



**Figura 8.7. Resultados *in vitro* de viabilidad celular en la línea HCT116. Efecto del fármaco en forma libre.**

Atendiendo a la figura 8.7 se observa una reducción drástica en la viabilidad a 48 horas, con valores cercanos al 0% para la mayoría de las concentraciones. Si se comparan estos resultados con los obtenidos con el fármaco en forma encapsulada se vuelve a poner de manifiesto la existencia de un mecanismo de liberación controlada que permite sostener el tratamiento, ajustando mejor la dosis a administrar. También se observa una diferencia en cuanto a la acción terapéutica si se compara con la eficiencia en cáncer de mama, donde aún quedaba

viabilidad celular a las 72 horas para las diferentes concentraciones ensayadas.

Todos estos resultados *in vitro* demuestran la eficacia terapéutica del nanosistema ensayado, y prueban la existencia de una liberación controlada del fármaco desde las nanopartículas.

### **3. USO COMBINADO CON PLATA EN GELES COMO BACTERIOSTÁTICO**

Otra aplicación de las nanopartículas de polifruktosa está basada en su combinación con plata para controlar el crecimiento microbiano.

La actividad bacteriostática de la plata se conoce desde hace al menos 200 años, y es debida a que la plata puede permear por la pared celular, e interrumpir procesos metabólicos para evitar la proliferación celular. Sin embargo, altas concentraciones de plata pueden causar argiriasis en los pacientes sometidos a este tratamiento. Por esta razón, se buscan sistemas de liberación controlada, como liposomas o hidrogeles, que controlen las dosis, localicen el efecto, y reduzcan así, los efectos adversos de estos tratamientos (Hadrup et al., 2018).

Hasta ahora, la mayoría de las partículas portadoras de plata, utilizan compuestos orgánicos para conseguir la reducción de la sal de plata, lo que conlleva un problema medioambiental importante, por el uso de esos solventes. El uso de biopolímeros, que puedan sustituir a esos compuestos orgánicos se plantea como una alternativa muy viable para este fin, y respetuosa medioambientalmente. Algunos como el almidón o el quitosano ya han sido empleados para este fin (Lavorgna et al., 2014).

Sin embargo, estos polímeros solamente pueden actuar como agentes de terminación de cadena, pero no como agentes reductores. En

estos casos, se han usado monosacáridos como glucosa y fructosa como agentes reductores. Sin embargo, la polifructosa o levan es capaz de actuar al mismo tiempo como agente de terminación de cadena y agente reductor para sales de oro y de plata como ya se ha demostrado anteriormente para fines catalíticos (Ahmed et al., 2014).

En el caso que se expone en este capítulo, se busca obtener nanopartículas con capacidad de control bacteriano, y, por tanto, para una aplicación tópica en infecciones ocurridas por estos patógenos. Por esta razón, se incluirán finalmente en un gel, dándole consistencia de sólido, y estudiando su liberación y efectividad. Finalmente, se estudió de forma teórica la liberación con el planteamiento de un modelo matemático basado en la supervivencia.

### **3.1. Síntesis de las nanopartículas combinadas con plata**

Para la obtención de las nanopartículas de plata, se empleó la polifructosa obtenida por vía enzimática, con la enzima Fructosil-transferasa aislada desde *B. subtilis*, siguiendo los métodos descritos en el capítulo 5. El polímero se precipitó utilizando etanol y congelación a -20°C, y después, recuperado por centrifugación para ser finalmente secado por liofilización (los detalles del protocolo se pueden encontrar en el capítulo 5).



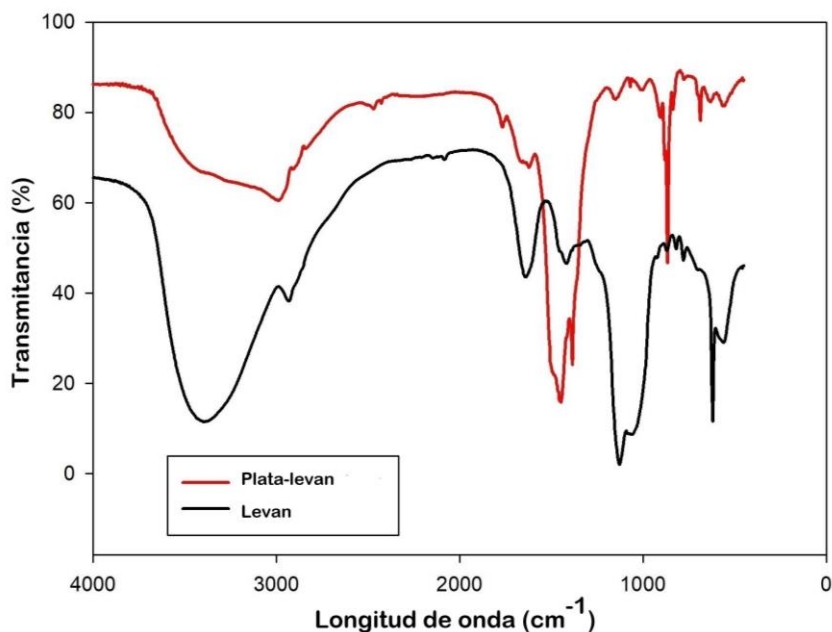
Para la síntesis de estas partículas, en primer lugar, se disolvieron 20 mg del polímero en 49 mL de una disolución acuosa básica, con NaOH al 0.2% en peso. Posteriormente, cuando se encuentra bien dispersado el polímero, se añadió 1 mL de una disolución 1 mM de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) preparada anteriormente. La mezcla se agitó a 25°C durante 10 minutos hasta conseguir formar las nanopartículas de plata.

Para separarlo del medio reaccionante, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las partículas se secaron por liofilización (a -55°C y 0.050 bar).

### **3.2. Caracterización de las nanopartículas**

Las partículas obtenidas se caracterizaron por diferentes técnicas: FT-IR, DLS, ICP-MS (espectrometría de masas acoplada a inducción por plasma); para estudiar el efecto de la reacción con el ion plata.

En primer lugar, se busca validar la presencia de plata en las nanopartículas de forma covalente, y, por tanto, con modificación de los enlaces químicos. Esto se llevó a cabo mediante espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), usando un espectrómetro Perkin-Elmer Spectra One. Se incluyeron las nanopartículas en pellets de bromuro potásico, y se tomaron 32 espectros consecutivos, con una resolución nominal de 4  $\text{cm}^{-1}$ . El resultado se muestra en la figura 8.8.

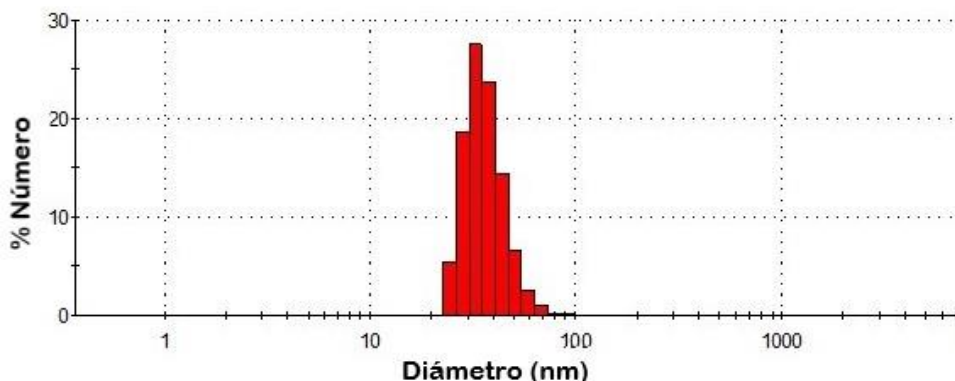


**Figura 8.8. Espectro FT-IR de las nanopartículas de plata-levan (rojo) y levan solo (negro).**

En la figura 8.8 se puede ver el espectro de las nanopartículas solas en negro, y el espectro de las nanopartículas de plata obtenidas (en rojo). Se puede ver cómo, cuándo se añade la plata, los picos de la región conocida como huella ( $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ) son modificados, puesto que se corresponden con las vibraciones de extensión (*stretching*) de los enlaces C-OH y C-O-C.

Por otra parte, las nanopartículas con plata se re-suspendieron en PBS, para la medición de la distribución de tamaño de partícula, y de su carga superficial (Zeta potencial) utilizando DLS con el equipo Malvern ZS Nano. En la figura 8.9. se representa el histograma de la distribución de tamaño de partícula medida en número. De la

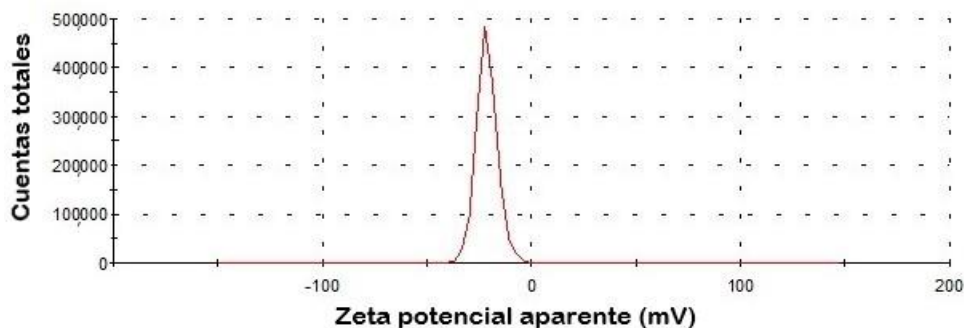
integración de las curvas, se obtiene un tamaño de partícula medio de  $36.9 \pm 11.8$  nm; lo que supone una reducción muy considerable en el tamaño, si se compara con las partículas de polifruktosa obtenidas antes de la reducción de plata. El valor de polidispersión (PDI) se sigue situando por debajo de 0.1.



**Figura 8.9. Histograma de la distribución de tamaño de partícula medida por DLS.**

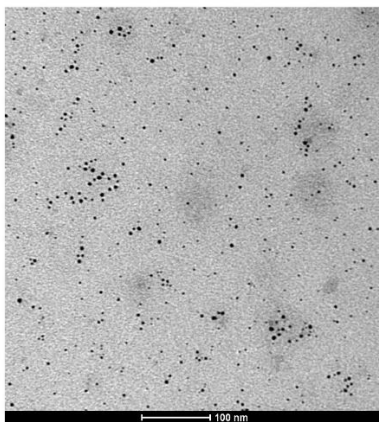
De igual forma, se observa un cambio importante en la carga superficial de las partículas, que se muestra representada en la figura 8.10. De la integración de dicha curva se obtiene un valor de  $-22.3 \pm 5.8$  mV, que previene de fenómenos de agregación y garantiza la estabilidad de la suspensión de partículas.

El incremento en valor absoluto en este parámetro es considerable si se compara con los valores de las partículas sin plata ( $-4$  mV). Este valor concuerda con otros valores presentados previamente en la bibliografía para nanopartículas de plata (Saeb et al., 2014).



**Figura 8.10.** Distribución de carga superficial de las nanopartículas.

Se buscó comprobar de igual modo, la morfología y la distribución de las nanopartículas mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM) con un equipo Zeiss EM902 a 80 kV previa preparación de la muestra en rejilla seguida de un proceso de desecación. La imagen del campo de partículas obtenido se muestra en la figura 8.11.



**Figura 8.11.** Imagen TEM de las nanopartículas de levadura.

Se puede apreciar una diferencia de tamaño comparado con el resultado obtenido por DLS, apreciándose de menor diámetro, debido fundamentalmente, al proceso de desecación de las partículas (Bhattacharjee, 2016). Las partículas tienen apariencia esférica y se muestran distribuidas de forma uniforme.

Finalmente, se cuantificó la cantidad de plata presente en las partículas, de cara a estudiar la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga de las mismas. Para ello, se empleó la técnica de Espectrometría de masas acoplada a inducción por plasma (ICP-MS) usando el equipo Emission Spectrometer modelo 7800 (Agilent Technologies). La masa usada fue 107 (g/mol) para la plata, con la potencia de radiofrecuencia de 1500 Watts y la bomba operando a 0.10 rps. Los caudales de los gases fueron los siguientes: 15.0 L/min para el gas plasma, 0.90 L/min para el gas auxiliar, 0.99 L/min para el gas de nebulización. Para calibrar el equipo, se usaron diferentes concentraciones (desde 0.2 a 10 ppm) desde una disolución certificada de plata a concentración de 1 g/L.

Considerando la concentración inicial de 125 ppm, se obtuvo una concentración de  $7.1 \pm 2$  ppm en el sobrenadante, encontrándose, por tanto, el resto, retenido en las partículas. Por tanto, se estima que el rendimiento de incorporación de plata es del 94.3%. La capacidad de carga se pudo calcular también, al conocer la concentración de polímero dispuesta (400 ppm), y, por tanto, resulta en una capacidad de carga del 29% (masa de plata/ masa de polímero).

### 3.2. Preparación de geles con nanopartículas

Para llevar a cabo el estudio de la liberación de las nanopartículas desde el gel, éstas deben ser introducidas en el mismo. Para ello, las nanopartículas de plata obtenidas, se incorporaron a una disolución de alginato sódico, preparada en agua, al 2% en peso. Como se describirá posteriormente, se introdujeron diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en el gel, y se añadió (directamente sobre el pocillo), 60  $\mu\text{L}$  de una disolución de cloruro de calcio al 2% por cada mililitro de disolución de alginato. El proceso de gelificación/reticulación resulta instantáneo (Blandino et al., 1999).

### 3.3. Efecto bacteriostático

Para validar el efecto bacteriostático de las nuevas partículas preparadas, se seleccionaron dos especies diferentes de bacteria. Una bacteria Gram positiva (*Bacillus subtilis*) y una bacteria Gram negativa (*Escherichia coli*). Ambas se cultivaron en placas de agar nutritivo a 30°C para conseguir colonias aisladas. Posteriormente, una colonia aislada fue resuspendida en medio fresco líquido de agar nutritivo, y se dejó crecer durante 6 horas antes de realizar el ensayo de supervivencia. Tras esas 6 horas, se midió la densidad óptica a 600 nm por espectrofotometría; y se realizó la dilución correspondiente para conseguir una densidad óptica de 0.1.

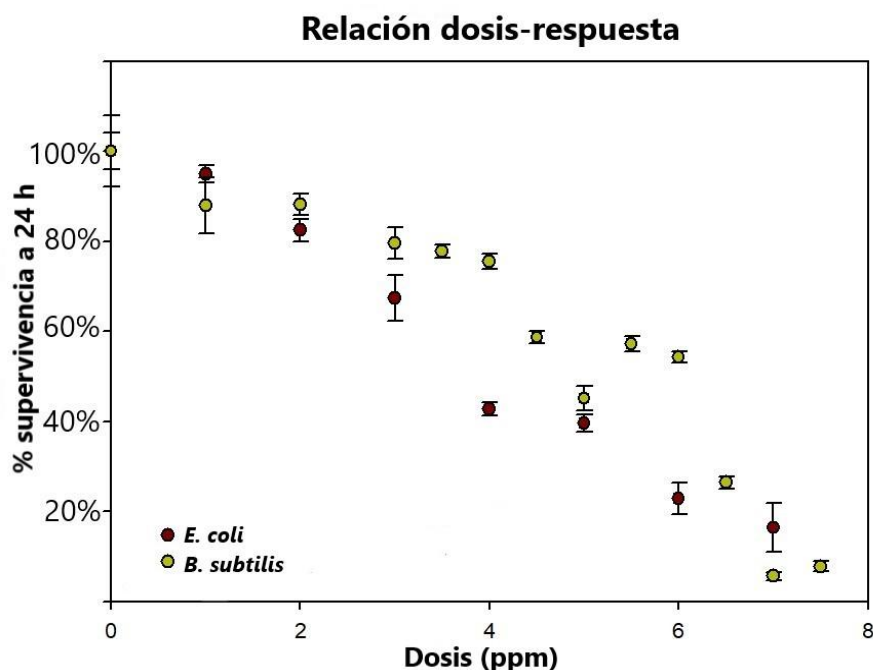
Para determinar la respuesta de las bacterias y estudiar el efecto bacteriostático, es necesario que las nanopartículas se encuentren en forma libre, para estudiar posteriormente su efecto al ser incluidas en el

gel. Para la realización de estos ensayos, con las nanopartículas libres en el medio de cultivo, se usaron placas multi-pocillo de 24 pocillos, donde cada pocillo (volumen final 1 mL) se preparó de la siguiente forma: 100  $\mu$ L de la disolución de nanopartículas a diferentes concentraciones, 100  $\mu$ L de una disolución de bacterias a densidad óptica de 0.1 (a 600 nm), 800  $\mu$ L de medio líquido de cultivo. Se usaron dos controles diferentes: un control con bacterias sin nanopartículas (para evaluar el máximo crecimiento), y otro control sin bacterias en el medio de cultivo (para observar que no exista contaminación por otro microorganismo).

Cada concentración de nanopartículas se estudió por triplicado. Se observó la absorbancia a 600 nm a tiempo 0 y a tiempo 24 horas usando un lector de placas multipocillo Microplate Reader: EZ Read 2000 (Biochrom); y el porcentaje de supervivencia para cada concentración se calculó usando el valor del control (100% supervivencia) como referencia.

En la figura 8.12 se muestra la evolución de la supervivencia a 24 horas a diferentes dosis de nanopartículas. En la figura se puede observar cómo la plata resulta más efectiva en las Gram negativas que en las Gram positivas. Estas diferencias en la supervivencia son acordes a los resultados presentados por Kawahara et al. (2000). La explicación que puede darse de este fenómeno es que las bacterias Gram positivas son menos susceptibles a los iones de plata por la existencia de una pared de peptidoglicano, que está cargada de forma negativa, y, por tanto, puede retener por interacciones electrostáticas muchos iones,

evitando su penetración a la célula. Otra posible explicación está fundamentada en el grosor de la pared celular (mucho más gruesa en bacterias Gram positivas). (Taglietti et al., 2012)



**Figura 8.12. Relación dosis-respuesta de las bacterias *E.coli* y *B. subtilis* al tratamiento con NPs de levan-plata.**

En segundo lugar, se realizaron los experimentos con las partículas contenidas en el gel. Donde se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de alginato que contiene las nanopartículas (a tres concentraciones diferentes) al final de cada pocillo, y seguidamente, se añade cloruro de calcio para que ocurra la reticulación, y con ello, la formación del gel. Las bacterias (100  $\mu\text{L}$ ) se añaden una vez formado el gel, y finalmente, el medio de cultivo fresco (800  $\mu\text{L}$ ).

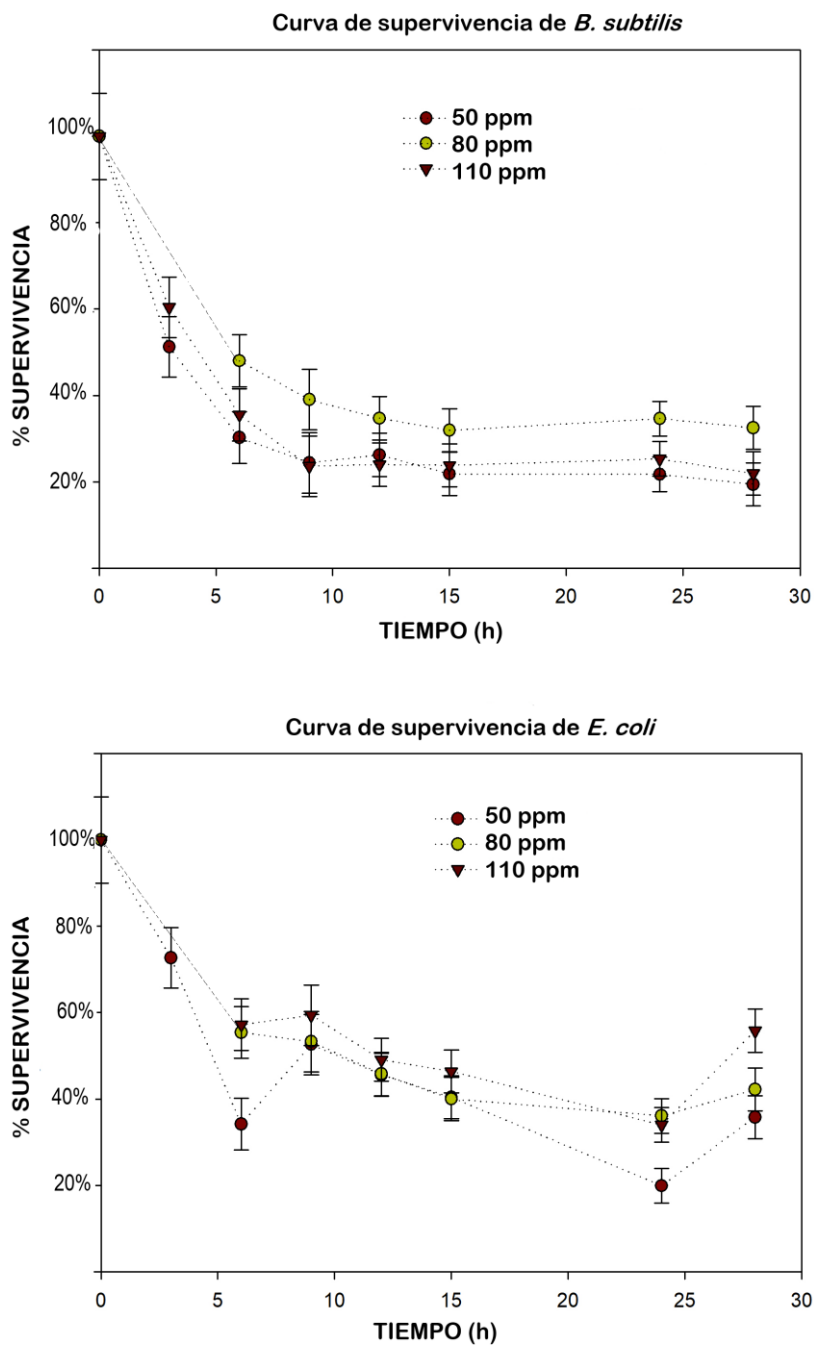


Se midió la absorbancia a 600 nm a los siguientes tiempos: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 24 y 28 horas, calculando también la supervivencia como porcentaje respecto al control. Se mantuvieron durante ese tiempo las placas multipocillo a 30°C y 150 rpm en un agitador orbital.

En la figura 8.13. se muestran las curvas de supervivencia para ambas especies a los diferentes tiempos descritos anteriormente. Los resultados arrojados sugieren que no hay diferencias significativas en la concentración de nanopartículas en el medio, y, por tanto, el proceso está controlado solamente por la liberación de partículas desde el gel.

Sin embargo, con el fin de comprobar si la plata es liberada en forma de nanopartículas o de iones desde el gel, se tomaron medidas de DLS tras 20 horas de cultivo. Los resultados muestran una distribución de tamaño de partícula semejante a la presentada en la figura 8.9 (alrededor de 35 nm), con un aumento en la intensidad del medio de cultivo, pasando de  $61.5 \pm 4.1$  a  $139.6 \pm 5.8$  kcps. Este incremento demuestra la existencia de más difracción de la luz, que es provocada por la liberación de las nanopartículas desde el gel hacia el medio líquido.

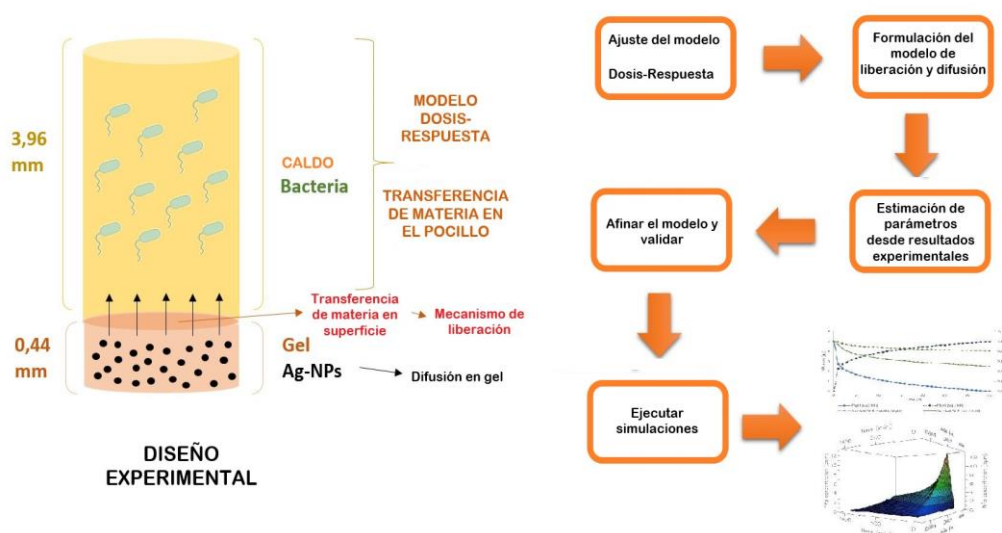
Las dosis obtenidas, están en concordancia con las presentadas anteriormente (figura 8.12), donde la dilución de la dosis 50 ppm a todo el medio (proporción 1:10) se convierte en 5 ppm, y con esa concentración es capaz de detener el crecimiento bacteriano para ambas especies, con supervivencias inferiores al 40%.



**Figura 8.13. Curvas de supervivencia para ambas bacterias con las NPs atrapadas en los geles de alginato.**

### 3.4. Modelización de la liberación y efecto de nanopartículas de plata y polifruktosa desde el gel

El planteamiento y validación del modelo de liberación se va a realizar en tres etapas diferenciadas. Primeramente, se modelará la relación dosis-respuesta de las partículas de forma libre (sin inclusión en gel). Seguidamente, el modelo de liberación de las nanopartículas desde el gel, y finalmente, el comportamiento de las partículas dentro del medio líquido una vez liberadas. El diseño del sistema, así como el diagrama de flujo empleado para la formulación del modelo, se encuentran resumidos en la figura 8.14.



**Figura 8.14.** Diseño experimental y etapas para la formulación del modelo de liberación y acción de las nanopartículas de plata.

El modelo se implementó en gPROMS 5.0.2 (PSE), con un total de 115 ecuaciones, de las cuales 111 fueron algebraicas, y 4

diferenciales. Se estudió la dispersión axial del gel, con una discretización en el eje z en 100 elementos infinitesimales. No se procedió a discretizar el medio de cultivo debido a que las condiciones de mezclado se consideran suficientes para asumir que no existe gradiente en el pocillo. El modelo necesita 3 segundos para ser ejecutado y simulado en un PC IntelCore I3 3,70 GHz y 4 GB de memoria RAM (gPROMS Advanced User Guide).

### 3.4.1. Modelado de la supervivencia

Para modelar la supervivencia de las bacterias expuestas a las nanopartículas se emplearon los resultados reflejados anteriormente, donde se analizó la evolución de la supervivencia con la dosis administrada. Tradicionalmente, se han planteado tres modelos para explicar los comportamientos dosis-respuesta microbianos (Yu et al., 2005):

- **Impacto-único/diana-única (*Single-hit/single-target*):** asume que cada bacteria tiene solamente una diana, y que inactivar esa diana supone matar la célula. Se formula con la ecuación 8.4. En ella la supervivencia, en porcentaje ( $S_v$ ), está relacionada exponencialmente con la dosis ( $D^{ose}$ ).

$$S_v = e^{-\alpha \cdot D^{ose}} \quad (\text{Ec.8.4.})$$

- **Impacto-múltiple/diana-única (*Multiple-hit/single-target*):** asume que una bacteria puede morir de dos formas, o por un solo evento letal, o por la acumulación de varios elementos sub-letales. Se formula en la ecuación 8.5, donde la supervivencia ( $S_v$ ) está

relacionada exponencialmente con una función cuadrática de la dosis ( $D^{ose}$ ).

$$S_V = e^{-(\alpha \cdot D^{ose} + \beta \cdot D^{ose^2})} \quad (\text{Ec.8.5.})$$

▪ **Impacto-único/diana múltiple (Single-hit/multiple-target):**

realiza varias suposiciones que se describen a continuación:

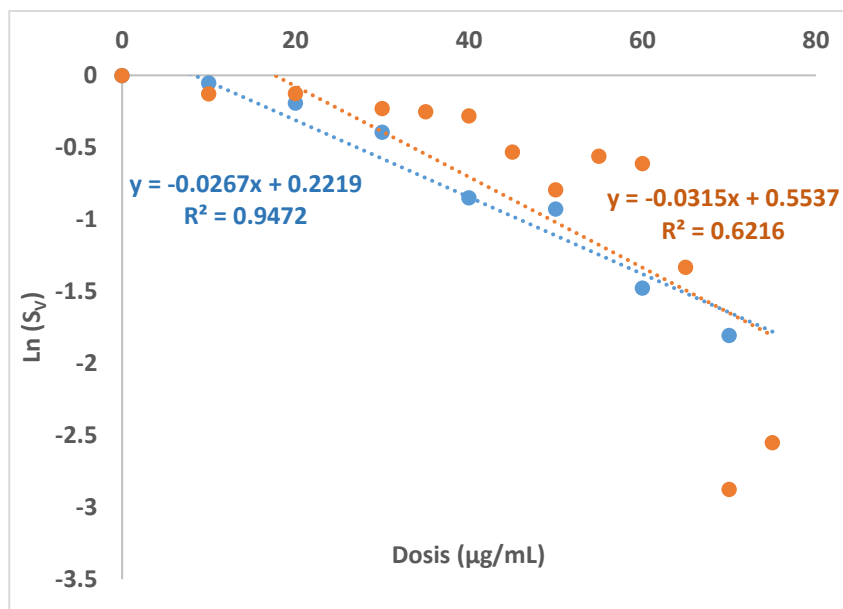
- Cada bacteria tiene n dianas
- Cada diana se inactiva por el paso/incorporación de una partícula
- Inactivar una diana es un evento sub-letal
- Todas las dianas se deben inactivar para matar

Se formula en la ecuación 8.6, donde se tienen que determinar los parámetros n (número de dianas) y  $D_0$  (dosis mínima inhibitoria), que correlacionan la dosis ( $D^{ose}$ ) con la supervivencia ( $S_V$ ).

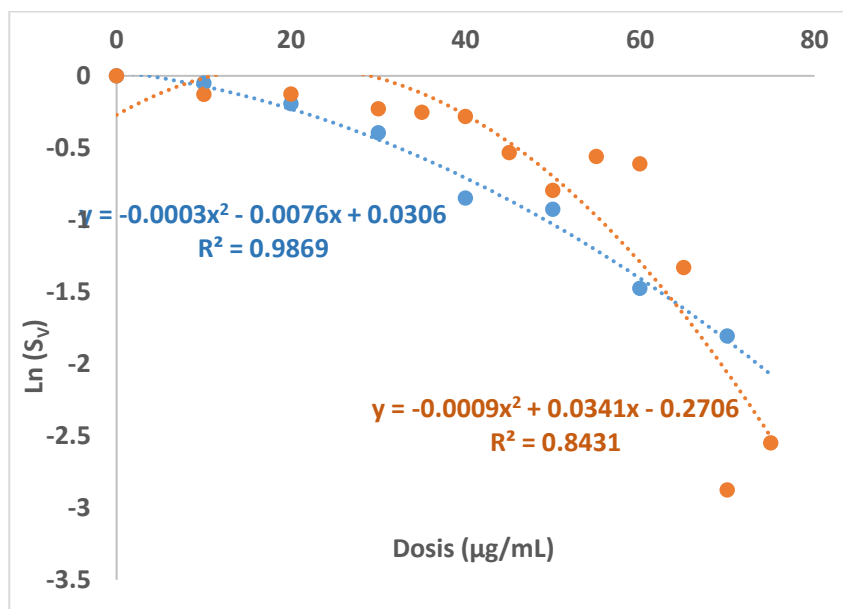
$$S_V = 1 - \left(1 - e^{-\frac{D^{ose}}{D_0}}\right)^n \quad (\text{Ec.8.6.})$$

Con los datos obtenidos, se linealizaron las ecuaciones 8.4, 8.5, y 8.6 y se ajustaron en los tres casos, para analizar qué modelo se ajusta mejor a los datos obtenidos, y, por tanto, comprender el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas.

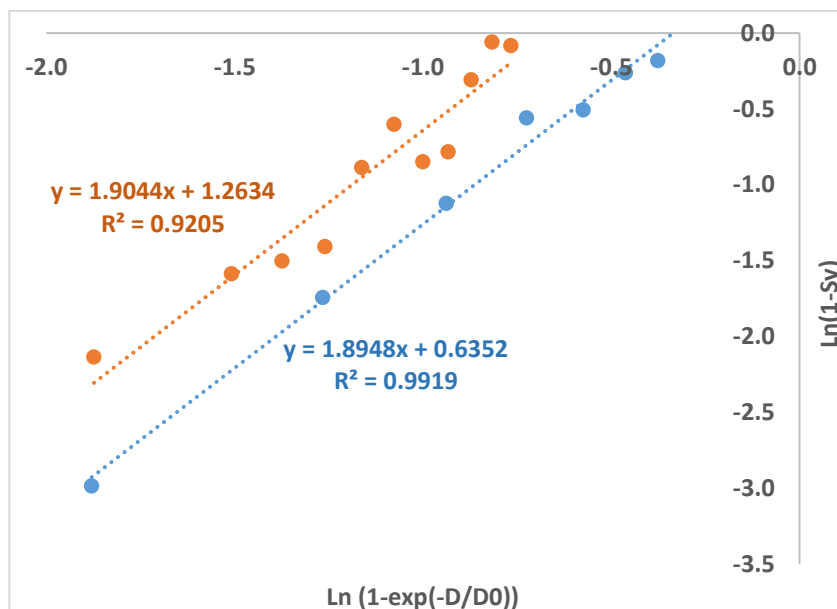
En las siguientes figuras (8.15, 8.16 y 8.17), se representan los datos de *B. subtilis* en color naranja, y los datos de *E. coli* en color azul, con las correspondientes ecuaciones de ajuste, también en esos colores.



**Figura 8.15. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto único - Diana única.**



**Figura 8.16. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto múltiple - Diana única.**



**Figura 8.17. Ajuste de los resultados de supervivencia a un modelo Impacto único - Diana múltiple.**

Tras el ajuste de los datos, se puede observar que, para ambas bacterias, el modelo de Impacto único y Diana múltiple es el que mejor explica el comportamiento de las bacterias en la presencia de nanopartículas de plata. De esta forma, por el ajuste, se determinaron también los parámetros  $n$  y  $D_0$ , que toman los valores recogidos en la Tabla 8.1.

**Tabla 8.1. Valores de los parámetros del modelo dosis-respuesta para ambas bacterias.**

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>n</i>	1.904	1.868
<i>D</i> <sub>0</sub> (ppm)	12.6	6.8

Los resultados ofrecen valores semejantes en cuanto al número de dianas (próximo a dos), y una dosis letal de aproximadamente el doble para el caso de la bacteria Gram positiva, coincidiendo con los trabajos previamente mencionados.

Una vez caracterizado el mecanismo de acción bacteriostática, se procedió a inmovilizar las nanopartículas de plata en un gel, como se ha comentado anteriormente. En este sistema (heterogéneo), la concentración en la superficie de la bacteria ( $C_{sur}$ ) será la que se considerará como dosis, para poder estimar la liberación de partículas desde los datos de supervivencia.

### 3.4.2. Modelado de las nanopartículas en el gel

Al iniciarse el experimento, antes de que comience la liberación, se asume que las nanopartículas están distribuidas homogéneamente en el gel. Sin embargo, el fenómeno de dispersión axial ocurre a medida que se produce la liberación de las partículas (la superficie de liberación es la parte superior del gel que se encuentra en contacto con el medio líquido). El número de partículas liberadas está relacionado con el número de partículas disponible para liberarse en la interfase, que se controla por la ecuación de Fick (ecuaciones 8.7 y 8.8).

$$\frac{N_{NPS}}{A} = -D_{ef} \frac{dC_{NPS}}{dz} \quad (\text{Ec.8.7.})$$

$$\frac{dN_{NPS}}{dz} + \rho_{gel} \cdot \pi \cdot r_w^2 \cdot v_r = 0 \quad (\text{Ec.8.8.})$$



Donde  $v_r$  es la velocidad de liberación desde el gel, y se define como la variación de la concentración dentro del gel con respecto al tiempo (ecuación 8.9.).

$$v_r = -\frac{dC_{in}}{dt} \quad (\text{Ec.8.9.})$$

Al sustituir la ecuación 8.7 en la 8.8, se obtiene la expresión final que explica el gradiente de concentración en las diferentes posiciones del eje z del gel, que se resume en la ecuación 8.10.

$$\pi \cdot r_w^2 \cdot \left( \rho_{gel} \cdot v_r - D_{ef} \cdot \frac{d^2 C_{NPs}}{dz} \right) = 0 \quad (\text{Ec.8.10.})$$

La velocidad de liberación se puede estimar utilizando la aproximación de Korsmeyer-Peppas (ecuación 8.11.) (Peppas et al., 2014)

$$\frac{dM_{out}}{dt} = M_{tot} \cdot k \cdot p \cdot t^{p-1} \quad (\text{Ec.8.11.})$$

Donde el balance de materia se muestra en la ecuación 8.12.

$$M_{in} + M_{out} = M_{tot} \quad (\text{Ec.8.12.})$$

Los parámetros k y p son los responsables de la velocidad de liberación desde el gel, y serán estimados utilizando la herramienta “*parameter estimation*” de gPROMS, cuyos resultados se mencionarán en la sección 3.5. La concentración en el interior del gel ( $C_{in}$ ), se puede

conocer sabiendo la masa en el interior del gel ( $M_{in}$ ) y el volumen de gel (en nuestras condiciones experimentales: 100  $\mu$ L).

### 3.4.3. Modelado de las nanopartículas en el medio líquido

El comportamiento de las nanopartículas en el medio líquido del pocillo se puede explicar usando la correlación con números adimensionales para placa multipocillo, propuesta por Doig et al. (2000), que se presenta en la ecuación 8.13.

$$Sh = 0.19 \cdot Re^{0.68} \cdot Sc^{0.36} \quad (\text{Ec.8.13.})$$

Desde el número de Sherwood ( $Sh$ ) se puede calcular el coeficiente de transporte de materia en el líquido ( $K_l$ ). Los números de Schmidt ( $Sc$ ) y Sherwood llevan implícito el uso del coeficiente de difusión ( $D_{if}$ ), que se podría calcular para estas nanopartículas desde la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 8.14.), usando el valor obtenido por DLS del radio hidrodinámico ( $r_H$ ).

$$D_{if} = \frac{k_b \cdot T}{6\pi \cdot \mu \cdot r_H} \quad (\text{Ec.8.14.})$$

La concentración de nanopartículas en el medio líquido ( $C_l$ ) se puede estimar como la diferencia entre el número de partículas liberadas desde el gel y el número de partículas internalizadas; tal y como se muestra en la ecuación 8.15. Ambas partes de la ecuación

están controladas por el coeficiente global de transferencia de materia ( $K_L a$ ), que es diferente dependiendo de la geometría. No es el mismo para una superficie planar como la que genera la liberación desde el gel ( $a_1$ ); que, para una superficie esférica, que se corresponde con la incorporación de nanopartículas por las bacterias ( $a_2$ ).

$$\frac{dC_l}{dt} = K_L a_1 \cdot (C_{int} - C_l) - K_L a_2 \cdot (C_l - C_{sur}) \quad (\text{Ec.8.15.})$$

La concentración en la interfase ( $C_{int}$ ) se puede estimar como el cociente entre la masa de nanopartículas liberada y un volumen diferencial (una fracción del método de discretización). La concentración en la superficie de la bacteria ( $C_{sur}$ ) se considera como la dosis ( $D^{ose}$ ) porque es la concentración real de incorporación de partículas.

### 3.5. Simulación y estimación de parámetros

La simulación se realizó utilizando gPROMS 5.0.2 (PSE) como se describió anteriormente. Utilizando dicho software, se pueden predecir los parámetros de la ecuación de Korsmeyer-Peppas:  $k$  y  $p$  (Peppas et al., 2014). Estos parámetros se estimaron a partir de los valores de supervivencia obtenidos a diferentes tiempos, para ambas bacterias y a tres concentraciones diferentes. Se seleccionó el modelo de varianza constante y el sensor para la estimación se fijó como una función dependiente de la variable supervivencia ( $S_v$ ), en un rango de  $10^{-5}$  a 0.1. Se fijaron como condiciones límite para la iteración, que

para el parámetro  $k$ , los valores se movieran en el rango 0-0.9, y que para el parámetro  $p$ , los valores se movieran en el rango 0-1.

Para el análisis estadístico, y con ello, la comprobación que se consiguió un buen ajuste, se calculó el valor ponderado de los residuales (WR) y se comparó con el valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con un intervalo de confianza del 95%. Se asumió que el modelo predice de forma efectiva los datos experimentales si el valor ponderado de los residuales es inferior al valor de chi-cuadrado. De lo contrario, se deberían realizar cambios en la formulación del modelo, para que reflejara de forma real el fenómeno que se trata de describir (Brook and Arnold, 1985).

En las figuras siguientes (8.18 y 8.19) se muestran los ajustes para cada condición a los datos experimentales.

Por otra parte, la Tabla 8.2. muestra los valores obtenidos para los dos parámetros estimados, así como el valor ponderado de los residuales del ajuste y del estadístico de chi-cuadrado. De igual forma, en la tabla 8.2 se presenta el número de iteraciones que necesitó el software hasta alcanzar la convergencia de los datos, y asociado a ello, el tiempo empleado de computación para obtenerlo.

**Tabla 8.2. Parámetros estimados y estadística de la estimación para la liberación de NPs desde el gel en ambas especies.**

<i>Especie</i>	<i>Concentración NPs plata (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>	<i>k (s<sup>-p</sup>)</i>	<i>p</i>	<i>WR</i>	<i><math>\chi^2</math></i>	<i>Número de iteraciones</i>	<i>Tiempo de ejecución (s)</i>
<i>E. coli</i>	<b>50</b>	0.135	0.266	7.99	11.07	57	17
	<b>80</b>	0.205	0.181	6.99	9.49	64	21
	<b>110</b>	0.328	0.116	3.11	11.1	36	10
<i>B. subtilis</i>	<b>50</b>	0.715	0.203	0.82	12.59	20	7
	<b>80</b>	0.900	0.129	0.51	11.07	27	8
	<b>110</b>	0.156	0.262	2.25	12.56	27	8

Los resultados obtenidos en la estimación de parámetros muestran que en todos los casos el valor ponderado de los residuales (WR) es inferior al valor de chi-cuadrado, lo que implica un buen ajuste de los datos experimentales. El número de iteraciones y el tiempo de ejecución para la estimación indican que el sistema está correctamente formulado, y la estimación es fácilmente conseguible con los datos experimentales obtenidos. En el caso del parámetro  $p$ , se asume que presenta un valor entre 0.11 y 0.26 para todos los sistemas.

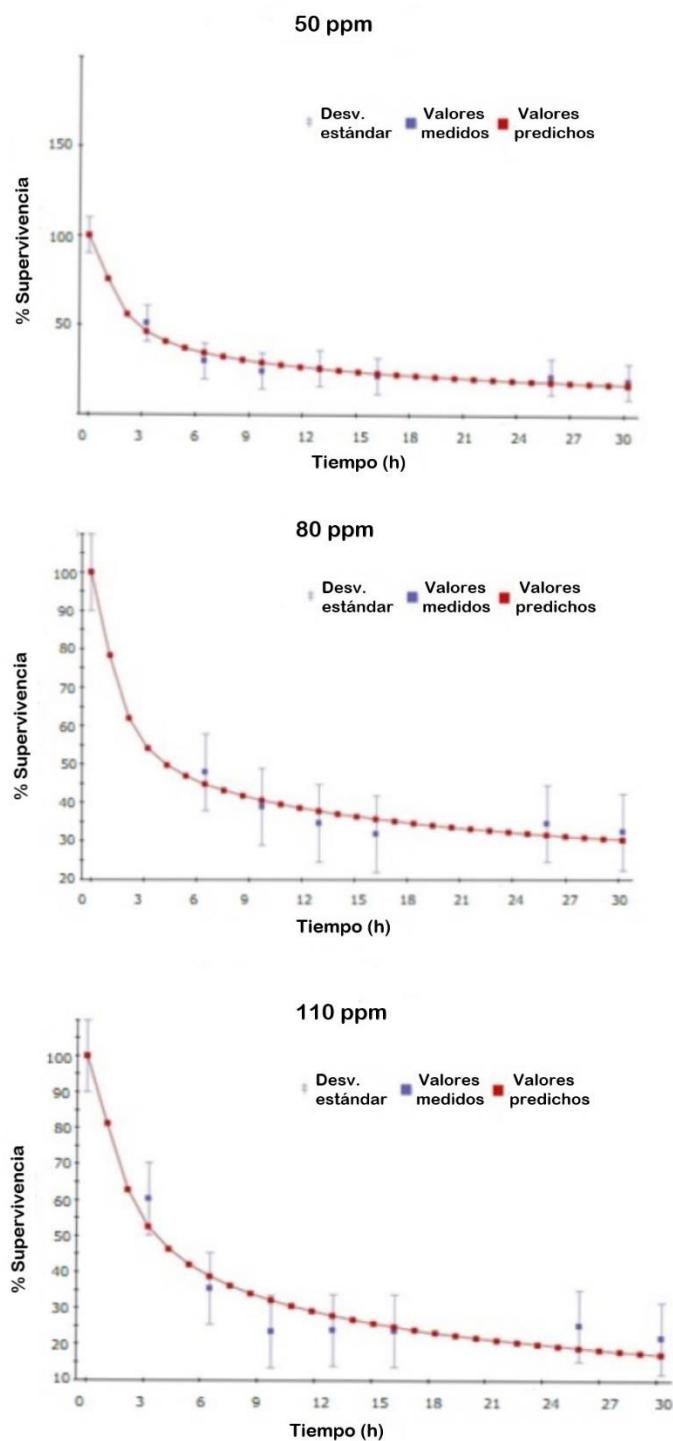
Este valor tiene un significado físico importante. Si  $p$  es igual a 1, se considera que sigue una cinética de orden cero, si  $p$  se sitúa entre 0.5 y 1, se dice que se tiene una cinética de liberación anómala, mientras que si  $p$  es menor de 0.5 se asume que la liberación del gel

está controlada por la difusión de Fick (Kostic et al., 2016). Con los valores que se han obtenido, se puede concluir que, la difusión de las partículas va controlada por la difusión de las mismas en el gel.

Para el caso del parámetro  $k$ , la mayoría de las estimaciones coinciden en situarlo alrededor de 0.2, con alguna excepción en los límites de la iteración. Este parámetro suele estar relacionado con las características estructurales del gel, y suele depender de su composición y viscosidad. A pesar de dichas diferencias, se puede calcular un valor promedio, que correspondería con 0.206 para  $k$ , y con 0.193 para  $p$ . Con esta media, el error estándar se sitúa en el 9%.

En la figura 8.18 se muestran los resultados del ajuste para los experimentos de *B. subtilis* a diferentes concentraciones (50, 80 y 110 ppm), y en la figura 8.19 los correspondientes a los experimentos de *E. coli*, también realizados a tres concentraciones (50, 80 y 110 ppm). Los resultados experimentales, con sus barras de error se muestran en azul, mientras que la predicción realizada por gPROMS (para cada hora del experimento) se encuentra en rojo. De igual forma, los valores predichos se encuentran unidos por una línea de tendencia en color rojo.

Se puede apreciar, en ambos casos, que la estimación ha sido realizada correctamente y el modelo es capaz de predecir con exactitud los valores experimentales obtenidos.



**Figura 8.18. Ajuste de los datos experimentales al modelo, para las concentraciones de 50,80, 110 ppm en *B. subtilis*.**

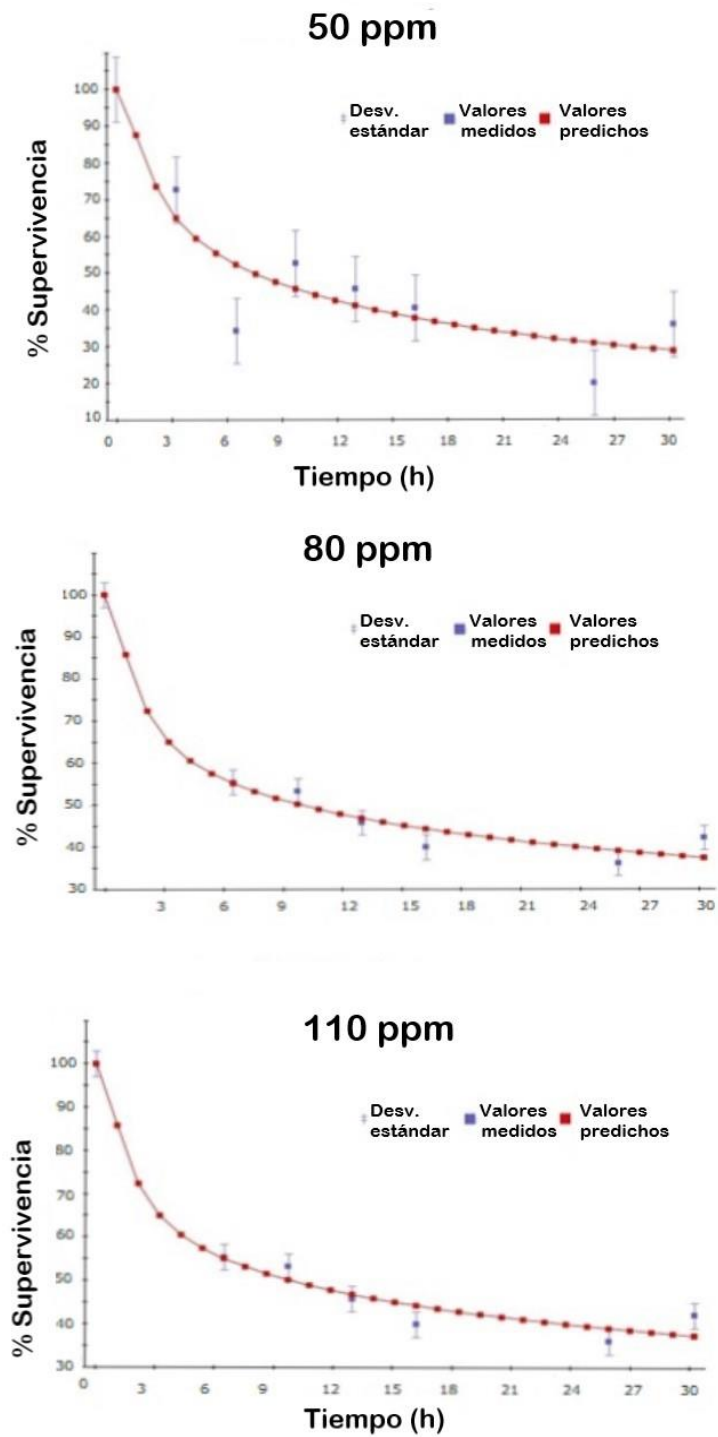


Figura 8.19. Ajuste de los datos experimentales al modelo, para las concentraciones de 50, 80, 110 ppm en *E. coli*.



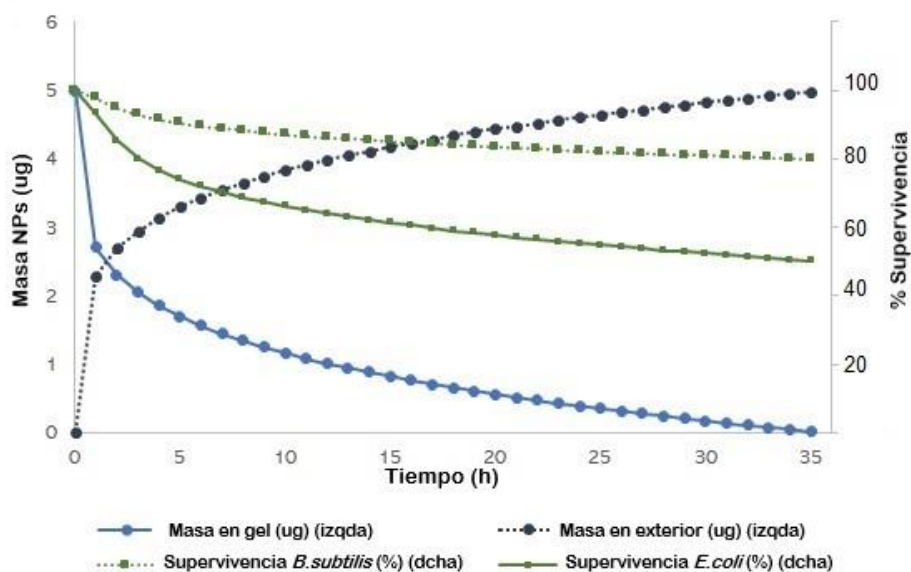
Con los valores promedios calculados para  $k$  y  $p$ , se ejecutaron simulaciones en gPROMS para conocer la evolución de otras variables que son consideradas en el modelo. Para ejecutar dichas simulaciones, fue necesario asignar valores a los parámetros tal y como viene descrito en la tabla 8.3. así como establecer las condiciones iniciales antes de ejecutar las simulaciones.

**Tabla 8.3. Valores de los parámetros usados para las simulaciones**

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia o fuente
<b>Parámetros fijados</b>			
<b>D<sub>P</sub></b>	0,017	m	Medido de la placa multi-pocillo
<b>D<sub>if</sub></b>	$1,23 \cdot 10^{-11}$	m <sup>2</sup> /s	Calculado desde la ecuación de Stokes-Einstein
<b>a<sub>1</sub></b>	$3 \cdot 10^6$	m <sup>-1</sup>	Calculado desde la geometría del gel
<b>a<sub>2</sub></b>	$2,27 \cdot 10^3$	m <sup>-1</sup>	Calculado desde el diámetro de la bacteria
<b>S<sub>AG</sub></b>	15,7	s <sup>-1</sup>	Valor fijado experimentalmente (150 rpm)
<b>ρ<sub>liq</sub></b>	1000	kg/m <sup>3</sup>	Valor tabulado para el agua
<b>ρ<sub>gel</sub></b>	1064	kg/m <sup>3</sup>	Determinado experimentalmente (picnometría)
<b>V<sub>GEL</sub></b>	0,1	mL	Del diseño experimental
<b>V<sub>w</sub></b>	0,9	mL	Del diseño experimental
<b>μ</b>	0.001	kg/m·s	Valor tabulado para el agua
<b>T</b>	298	K	Del diseño experimental
<b>R<sub>H</sub></b>	36	nm	Determinación experimental por DLS
<b>K<sub>B</sub></b>	$1,38 \cdot 10^{-23}$	J/K	Constante
<b>Condiciones iniciales</b>			
<b>C<sub>L</sub></b>	0	μg/mL	
<b>C<sub>SUR</sub></b>	0	μg/mL	
<b>M<sub>OUT</sub></b>	0	μg	

La figura 8.20 muestra las simulaciones realizadas para una concentración de plata en partículas de 50 μg/mL, usando cualquiera de las dos especies. En el eje de la derecha se representa la masa de partículas liberada (círculos azules, línea continua) y la masa de

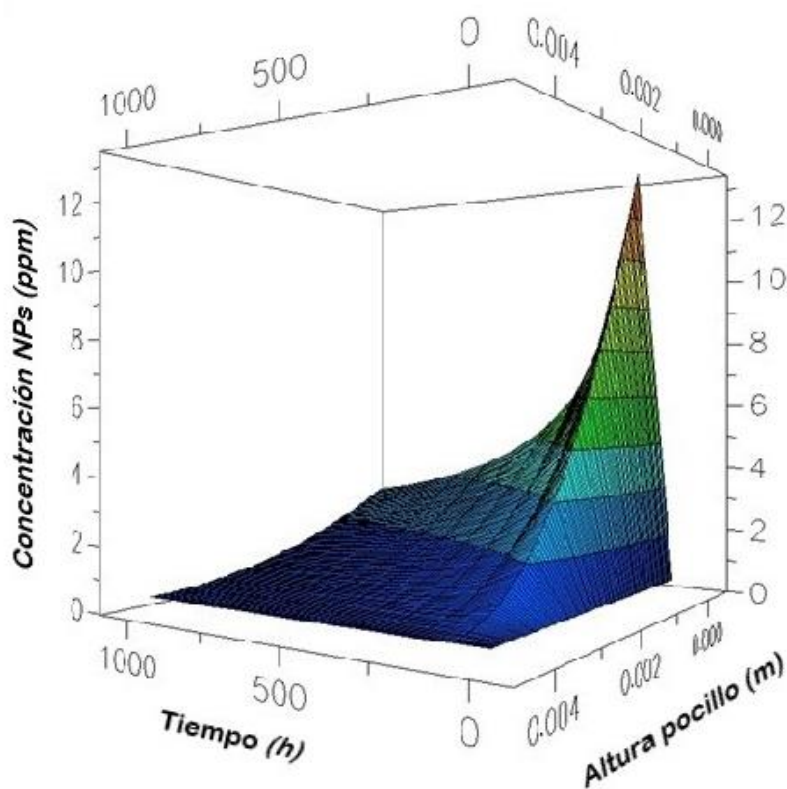
partículas que permanece en el gel (círculos azules, línea discontinua). Por otra parte, en el eje de la izquierda, se presenta la supervivencia para ambas especies: cuadrados verdes y línea continua para *B. subtilis*, y cuadrados verdes y línea discontinua para *E. coli*. La simulación muestra que se puede predecir la tendencia, aunque tratándose de un valor promedio, sería necesario ajustar más profundamente los parámetros a las variaciones de las especies, para conseguir una predicción idónea de los resultados experimentales.



**Figura 8.20. Simulación de la liberación de NPs y supervivencia de las bacterias.**

Finalmente, la figura 8.21 representa la evolución de la concentración de las nanopartículas (eje z) a lo largo del gel (eje y) a diferentes tiempos (eje x). Este gráfico en tres dimensiones simula cómo la difusión controla el proceso de liberación, y el gradiente de concentraciones que se forma dentro del gel (dispersión axial). Estos

resultados podrían usarse posteriormente para optimizar cualquier liberación de nanopartículas desde un gel con fines de administración por vía tópica.



**Figura 8.21.** Perfil de concentraciones de NPs en diferentes alturas de pocillo a lo largo del tiempo.

#### **4. RECUBRIMIENTO DE PRÓTESIS DE TITANIO PARA PREVENCIÓN DE INFECCIONES EN IMPLANTES**

Las enfermedades de hueso y de las articulaciones son una de las principales patologías crónicas que se presentan en los pacientes mayores de cincuenta años en los países desarrollados. Se estima que aproximadamente el porcentaje de la población que sufre estas patologías llegue a duplicarse para el año 2020 (Navarro et al., 2008). Los implantes son una solución importante a estos problemas, tratando de corregir los defectos presentes en huesos y articulaciones. Los implantes deben tener una estructura y superficie compatible con el tejido donde van a ser implantados, además de unas adecuadas propiedades mecánicas y físico-químicas (Ribeiro et al., 2012). Se han descrito numerosos materiales para estos fines, que abarcan desde metales (aleaciones de titanio-aluminio-vanadio, o de cromo-cobalto-molibdeno), polímeros como polimetil metacrilato, o cerámicas como alumina, zirconia o hidroxiapatita.

De todos ellos, las aleaciones de titanio y de cromo-cobalto son las más empleadas para las artroplastias de articulación total. Entre ellas, su principal diferencia en el uso depende de la existencia o no de una superficie de apoyo. Por esto, las aleaciones de cromo-cobalto son más empleadas en las cabezas femorales, mientras que las aleaciones de titanio son más usadas en los cuellos femorales.

La infección del implante es el principal problema y limitación para conseguir terminar de forma exitosa estos tratamientos. La infección puede venir de la sala de operación o del material de trabajo quirúrgico, o también de la presencia de bacterias en la piel y en el interior del propio paciente. La infección ocurre porque se produce una adhesión importante de bacterias a los implantes, formando un bio-film alrededor suyo (Zilberman et al., 2008). Las dos especies que principalmente forman el bio-film son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La formación de este biofilm conlleva tres problemas importantes (Trampuz et al., 2003):

- El biofilm supone un reservorio de bacterias importante, que, de ser repartido al resto del cuerpo, produciría una infección crónica.
- Las bacterias en el biofilm se vuelven resistentes a muchos antibióticos, siendo más complicado controlar la infección.
- Debido a que, en muchas ocasiones, la respuesta inflamatoria no es capaz de eliminar la población bacteriana, se genera una respuesta inflamatoria crónica.

Por estas razones, la prevención de la adhesión bacteriana a las prótesis e implantes utilizados es crucial para asegurar un buen tratamiento.

Desde el Servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Salamanca, específicamente el Dr. Juan Blanco, se nos solicitó la posibilidad de preparar un recubrimiento para estas prótesis que tratase de evitar los efectos que se han mencionado anteriormente. Debido a

esta demanda se plantea el desarrollo de esta aplicación cuyo principal objetivo es la elaboración de un recubrimiento para evitar la adhesión bacteriana, y con ello, la respuesta inflamatoria en el paciente.

Para materializar dicho objetivo, se trabajó utilizando el biopolímero levan, basado en polifruktosas; que crea un recubrimiento alrededor del implante que impide estos fenómenos anteriormente descritos.

Es conocida desde antiguo la capacidad antiséptica de los azúcares, especialmente la miel (Israili, 2014). Por esta razón, siendo conscientes de tener sintetizado un polímero basado en el azúcar fructosa, se plantea la posibilidad de estudiar un recubrimiento de las prótesis de titanio-aluminio-vanadio, de tal forma que se cree un ambiente hiperosmótico, y con elevada concentración de azúcares, de tal forma que no se produzca la adhesión bacteriana al implante.

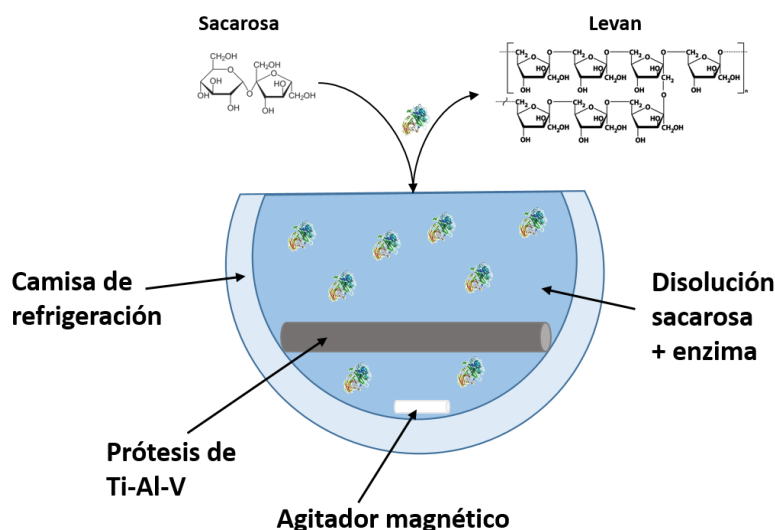
A lo largo de esta sección del capítulo se abordará la síntesis de este recubrimiento sobre el implante, y se mostrarán los resultados de la caracterización físico-química y estructural del recubrimiento producido (mediante rayos X, y microscopía electrónica de barrido). Finalmente, se analizará la eficacia del recubrimiento al ser expuesto a cultivos bacterianos de *Staphylococcus*.

#### **4.1. Proceso de recubrimiento de la prótesis con el polímero levan**

Las prótesis de titanio-aluminio-vanadio, de longitud 5 cm, fueron introducidas en un reactor encamisado de AFORA, de capacidad

150 mL, donde se prepara la disolución necesaria para que comience la polimerización (90 g/L de sacarosa y 0.2 ppm de enzima fructosil-transferasa 68S, obtenida desde *B. subtilis*). La prótesis de titanio se mantiene sumergida debido a la configuración del reactor, permaneciendo bajo ella el agitador magnético a una velocidad de 150 rpm. La temperatura de la reacción se mantiene a 37°C gracias a un baño termostatzado que bombea agua por la camisa del reactor. En la figura 8.22 se muestra un esquema del diseño de la instalación para la generación de este recubrimiento.

La reacción se mantiene durante 24 horas, al cabo de las cuales, la prótesis se retiró con ayuda de unas pinzas estériles, y se dispuso en una placa Petri donde se secó al ser puesta en contacto con la atmósfera. Pasadas 24 horas, el recubrimiento se consideró seco, y es posible realizar las diferentes caracterizaciones que se muestran en el apartado siguiente.



**Figura 8.22. Esquema del diseño experimental de la polimerización de levan alrededor de una prótesis de titanio, aluminio y vanadio.**

## 4.2. Caracterización del recubrimiento

Para la caracterización completa del recubrimiento de la prótesis de Ti-Al-V se realizaron dos pruebas diferentes: la difracción de Rayos X y la microscopía electrónica de barrido (SEM), acoplada a análisis EDX (*Energy Dispersive X-ray Spectrometry*) que se detallan en los siguientes apartados.

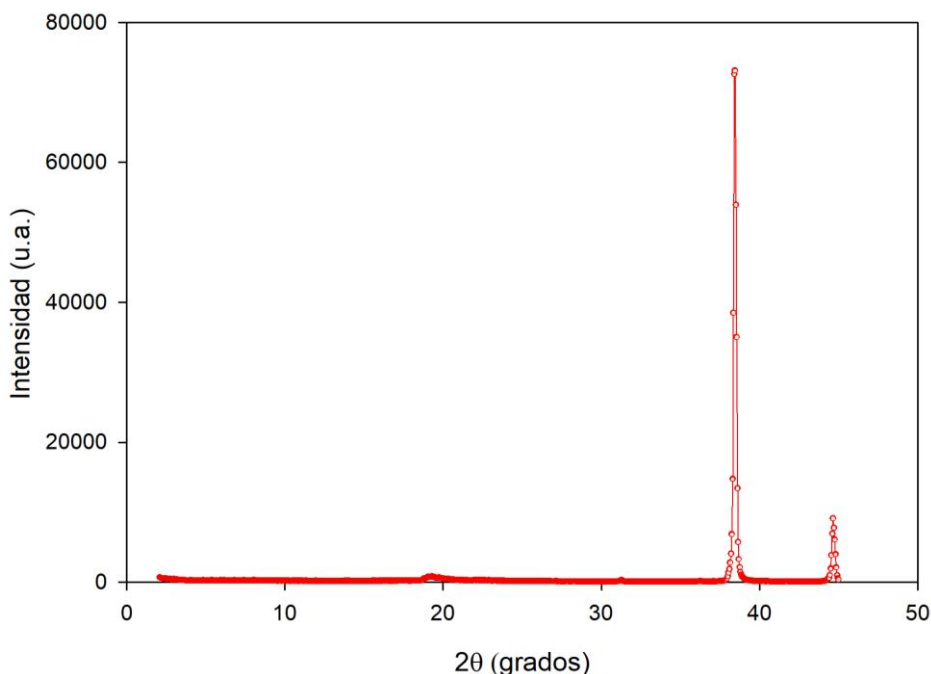
### 4.2.1. Difracción de Rayos-X

Con el fin de caracterizar si el recubrimiento presenta una distribución amorfa o cristalina, se procedió a realizar difracción de Rayos-X de la prótesis con el recubrimiento, estudiando las diferentes señales obtenidas. La Difracción de Rayos-X (XRD, por sus siglas en inglés, X-ray diffraction), se realizó en un difractómetro Siemens D-500, equipado con el procesador DACO-MP y con un ánodo de cobre y filtro de grafito. Se estudió el rango de ángulo  $2\theta$  desde  $2^\circ$  hasta  $45^\circ$ , tomando valores cada  $0.05^\circ$ .

El resultado del patrón de difracción se muestra en la figura 8.23. donde se distinguen tres picos, con diferentes intensidades, en los ángulos  $19^\circ$ ,  $38^\circ$  y  $44^\circ$  aproximadamente. Los dos últimos son marcados con bastante intensidad, mientras que el pico resultante a  $19^\circ$  es ampliado en la figura 8.24. De acuerdo con Kekez et al (2016), el levan presenta un pico de cristalinidad a  $19^\circ$ , que se ve enturbiado debido al proceso de precipitación del polímero, quedando en muchos casos, organizado de forma amorfa. Por otra parte, Wysocki et al. (2017),



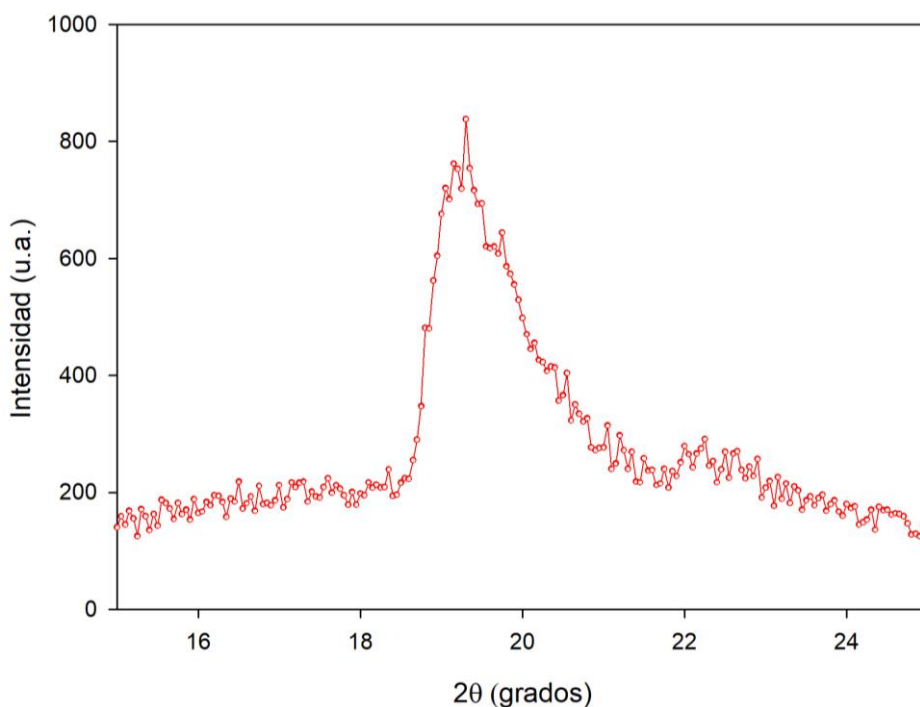
caracterizaron la prótesis de forma aislada, e identificaron un gran pico alrededor de  $40^\circ$ , que encaja con la señal obtenida en nuestro caso.



**Figura 8.23. Patrón de difracción de rayos-X para la prótesis de Ti-Al-V recubierta con el biopolímero *levan*.**

Para una mejor valoración de la cristalinidad del recubrimiento, se procedió a aumentar la zona correspondiente a los ángulos de valores entre  $15$  y  $25^\circ$ , que se representan en la figura 8.24.

En dicha figura, podemos comprobar cómo se mantiene la cristalinidad, con un pico bastante definido, de tal forma que se puede considerar que el recubrimiento de la prótesis de Ti-Al-V tiene una distribución cristalina.



**Figura 8.24. Ampliación del patrón XRD, en la sección 15°-25°.**

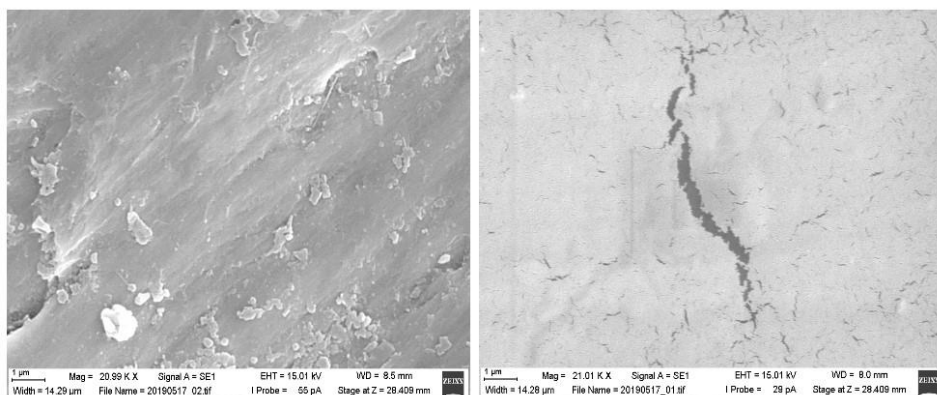
#### 4.2.2. Microscopía electrónica de barrido. Análisis EDX.

Con el fin de validar la existencia de recubrimiento, y observar su disposición y grosor se empleó la microscopía electrónica de barrido utilizando el servicio prestado por el Centro de Láseres Pulsados (CLPU), como centro adscrito a la Universidad de Salamanca.

El microscopio empleado es el SEM EVO HD25 (*Carl Zeiss Microscopy*), que lleva acoplado un sistema de rayos X para poder realizar un análisis elemental de la muestra analizada, mediante la técnica conocida como EDS o EDX (*Energy Dispersive X-ray*

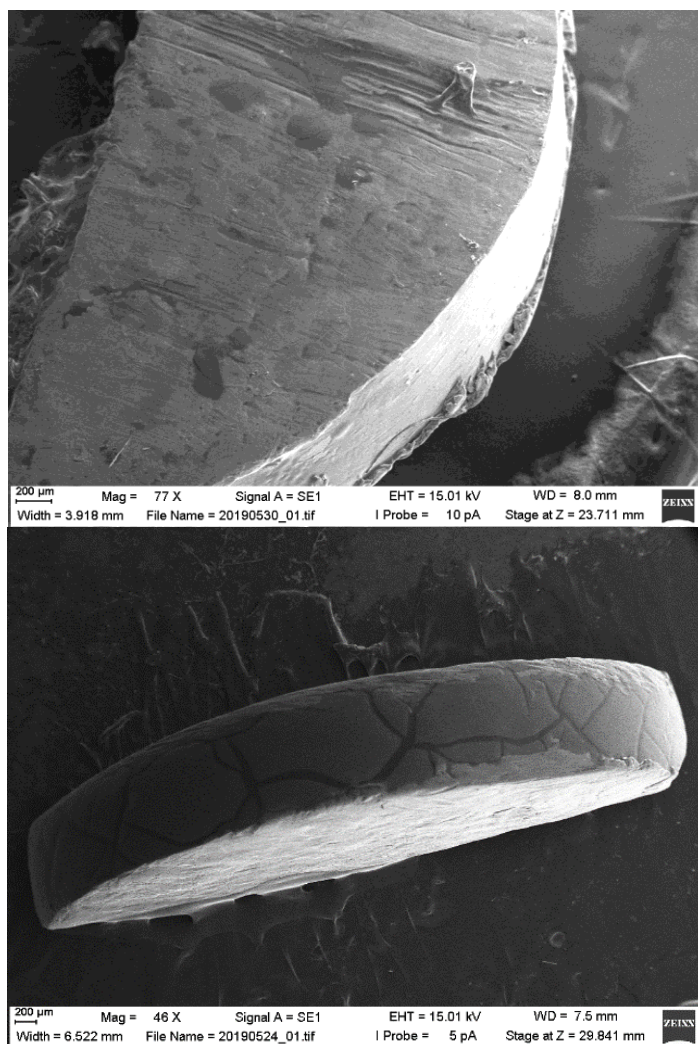
*Spectrometry*). Esta técnica permite calcular la proporción de cada uno de los elementos de la muestra en la superficie de la misma.

En la figura 8.25 se muestra la comparación, con los mismos aumentos, de una prótesis sin recubrir (izquierda) y otra prótesis recubierta por el polímero levan (derecha). Se puede apreciar, en el caso de la prótesis recubierta, la presencia de un campo homogéneo solamente interrumpido por la presencia de grietas, que podrían deberse al proceso de secado del material.



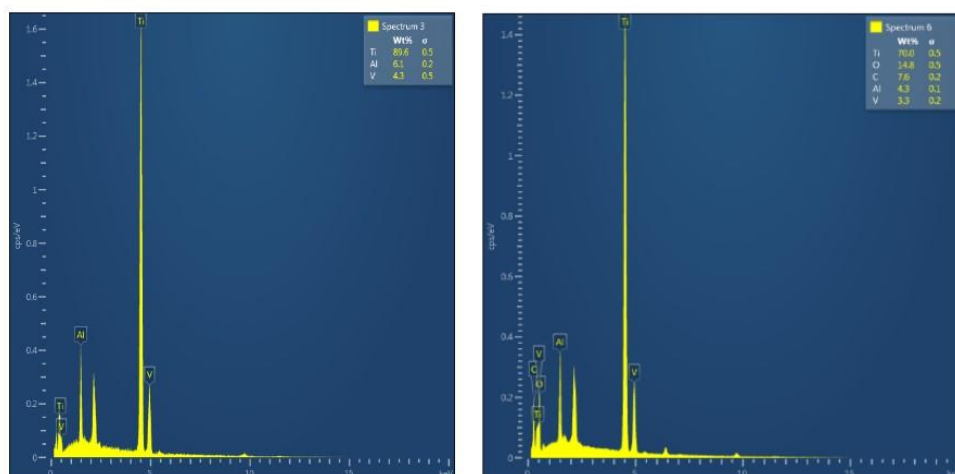
**Figura 8.25. Imágenes de microscopía SEM de prótesis sin recubrir (izquierda) y prótesis recubierta (derecha).**

Incluso, se pudo certificar la presencia de recubrimiento al observar una vista de alzado o de perfil de la prótesis, como se muestra en la figura 8.26. Al prestar atención a los bordes de la prótesis, se observan diferentes capas, con distintas intensidades luminosas proporcionadas por el SEM, indicando la presencia de varias capas de recubrimiento.



**Figura 8.26.** Vistas de alzado y perfil de la pieza de prótesis una vez recubierta.

Finalmente, se procedió al análisis mediante rayos X de la composición elemental del material objeto de estudio, resultando los espectros de Rayos X (EDX) que se muestran en la figura 8.27, donde aparece el espectro de la prótesis antes de ser recubierta (izquierda) y tras el proceso de recubrimiento (derecha). Los resultados de la composición porcentual en masa se presentan, para ambos casos, en la Tabla 8.4.



**Figura 8.27.** Espectros obtenidos por análisis EDX de las imágenes de microscopía electrónica.

**Tabla 8.4.** Composición elemental de las prótesis analizadas por EDX.

<i>Elemento</i>	<i>Prótesis sin recubrir</i> (% peso)	<i>Prótesis recubierta</i> (% peso)
<i>Ti</i>	$89.6 \pm 0.5$	$70.0 \pm 0.5$
<i>Al</i>	$6.1 \pm 0.2$	$4.3 \pm 0.1$
<i>V</i>	$4.3 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.2$
<i>C</i>	0.0	$14.8 \pm 0.5$
<i>O</i>	0.0	$7.6 \pm 0.2$

De los resultados del análisis EDX se pueden apreciar las diferencias en cuanto a la composición porcentual. En la prótesis recubierta se observa la presencia de Carbono y Oxígeno mientras que, en el caso de la prótesis sin recubrir, los resultados obtenidos cumplen las especificaciones señaladas por el fabricante (un 6% de aluminio y

un 4% de vanadio, siendo el resto titanio). La presencia de C y O indica la presencia de polímero levan, compuesto por estos dos elementos y por hidrógeno. Sin embargo, este último, al ser un elemento muy ligero, no puede identificarse mediante EDX.

En el caso de los datos obtenidos por EDX de la prótesis recubierta se observa una reducción del porcentaje en masa de los elementos de la prótesis (Ti, Al, V), aunque se mantiene la proporción descrita por el fabricante (90/6/4% respectivamente).

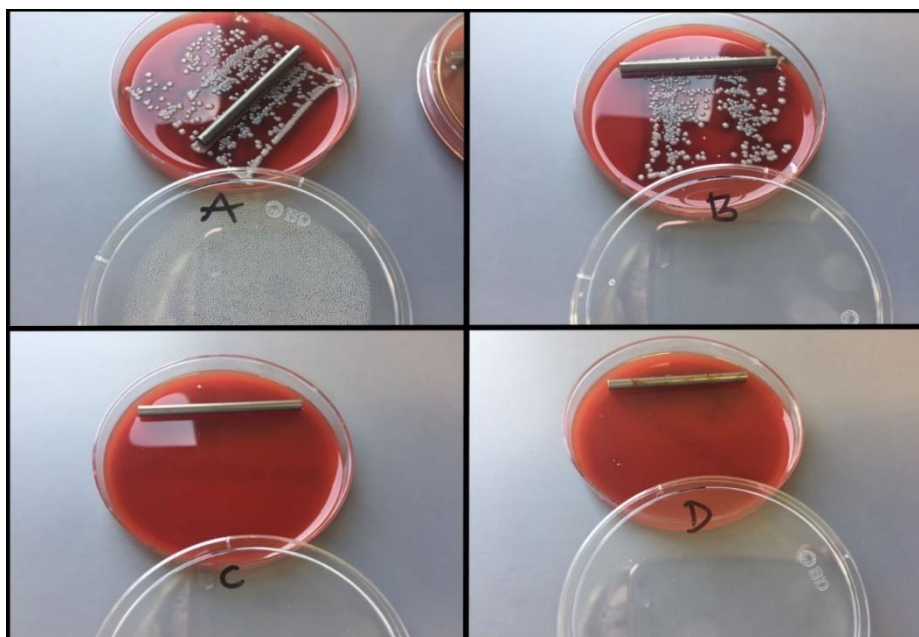
Si se adicionan los valores correspondientes a la prótesis de titanio obtenemos un valor de un 77.6% en peso, mientras que si se adicionan los correspondientes al recubrimiento, obtenemos un valor del 22.4% en peso. De esta forma, la relación másica entre recubrimiento y prótesis se situaría en el 28.9% en peso.

#### **4.3. Estudios celulares con *Staphylococcus*. Eficiencia de prevención de la adhesión celular.**

Uno de los principales patógenos de estas prótesis es el género *Staphylococcus* como se ha mencionado en la introducción de esta sección. Para comprobar la eficacia del recubrimiento se sumergieron cuatro prótesis en una suspensión (70 mL) de *Staphylococcus* durante 16 horas, con agitación constante a 70 rpm (Chik et al., 2018). Dos de estas prótesis (nombradas A y B) no habían sido recubiertas con el polímero, mientras que otras dos (nombradas C y D) habían sido recubiertas siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Tras el proceso de inmersión, las prótesis fueron depositadas en placas de agar sangre, un medio rico, que permite el crecimiento de prácticamente todos los microorganismos que pudiesen estar presentes. El agar sangre está compuesto por infusión de corazón, peptona de carne y cloruro sódico a concentraciones de 10 g/L, 10 g/L y 5 g/L respectivamente.

Los resultados se muestran en la figura 8.28 para las cuatro prótesis ensayadas.



**Figura 8.28. Efecto del recubrimiento en la adhesión y crecimiento de bacterias. Placas A y B: prótesis no recubiertas. Placas C y D: prótesis recubiertas con levan.**

En la figura 8.28 se pueden ver abundantes colonias en las dos placas que contienen las prótesis no tratadas (A y B), de tal forma que se puede concluir que sí ocurrió adhesión bacteriana en las prótesis

durante el proceso de inmersión. Sin embargo, en las prótesis tratadas (C y D) no se observan apenas colonias bacterianas (1 colonia detectada en C y 3 colonias en D).

Estos resultados sugieren que el recubrimiento de la prótesis protege considerablemente de la adhesión bacteriana, y podría resultar un proceso importante para mejorar la vida útil de las prótesis, facilitando una mayor calidad de vida a los pacientes que han de portarlas.



## **5. CONCLUSIONES**

En este capítulo se han presentado tres potenciales aplicaciones del biopolímero levan, para solventar algunos de los principales retos a los que se enfrenta la biomedicina en el siglo XXI: el tratamiento de tumores, el control del crecimiento bacteriano, la prevención de las infecciones en prótesis.

En el caso del tratamiento de tumores, se ha conseguido retener un fármaco citostático (5-fluorouracilo) en nanopartículas de levan, las cuales se han caracterizado y evaluado en cultivos celulares de cáncer de colon (principal diana de este fármaco) y de cáncer de mama. Los resultados muestran cómo el polímero levan constituye un buen sistema transportador de fármacos, ofreciendo una liberación controlada con buena acción terapéutica, siendo capaz de reducir la viabilidad celular por debajo del 20% pasadas 72 horas. De igual forma, se pudo comprobar la no toxicidad de las nanopartículas, al observarse un crecimiento semejante al control cuando se administraron nanopartículas vacías. La acción terapéutica de este fármaco se vio más efectiva en cáncer de colon que en cáncer de mama.

Para el control del crecimiento bacteriano, se diseñaron unas nuevas nanopartículas donde el biopolímero ejerce como agente reductor del metal plata, que pudieron ser internalizadas en un gel, del que se van liberando de forma sostenida, siendo capaces de reducir la población bacteriana a la que es expuesto. Se procedió a la caracterización de las nanopartículas, así como a la modelización de la

liberación de las mismas y de la supervivencia de las bacterias (Gram positivas y Gram negativas) expuestas a ellas.

Finalmente, como última aplicación, se utilizó el polímero como potencial recubrimiento para impedir la bioadhesión de patógenos en prótesis de titanio-aluminio-vanadio. Se caracterizó el recubrimiento mediante técnicas físico-químicas y mediante microscopía electrónica, donde se pudo observar el cambio en la superficie, asociado a diferencias en los elementos determinados por EDX. Finalmente, estas prótesis fueron evaluadas en cultivos de *Staphylococcus* y cultivadas en placas de agar sangre, observándose crecimiento microbiano en el caso de las prótesis no recubiertas, mientras que no se apreciaron colonias en las prótesis recubiertas.

---

**Artículos publicados relacionados con el capítulo:**

Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies. *Carbohydrate Polymers* 160 (2017), 26-33. Año 2017.

Levan-capped silver nanoparticles for bactericidal formulations: Release and activity modelling. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2019), 1502.





# **Capítulo 9**

---

## **Conclusiones**



A la vista de los resultados obtenidos, que se han presentado a lo largo de los diferentes capítulos de la tesis doctoral, se han extraído las siguientes conclusiones:

- El biopolímero levan es producido por una amplia variedad de bacterias que utilizan la enzima levan-sacarasa para su síntesis. Las enzimas estudiadas, en más de 100 especies diferentes, presentan regiones conservadas que coinciden con la presencia de residuos importantes para la catálisis enzimática.
- Se ha identificado el péptido-señal que controla el mecanismo secretivo de la enzima al exterior celular, y se han clasificado las enzimas en 8 grupos o clades según la homología de sus secuencias, estando muy relacionados con su origen y desarrollo evolutivo.
- Hay diferencias en las cinéticas de producción de levan, entre las bacterias Gram positivas (*B. subtilis* como ejemplo) y Gram negativas (*A. nectaris* como ejemplo), debido al efecto que ejerce la membrana externa. Las bacterias Gram negativas presentan una inhibición por intermediario (glucosa); y en ambos casos, se sigue una cinética de Leudeking-Piret, donde la producción va acoplada al crecimiento de la biomasa.
- El polímero obtenido cumple con las características propias de una polifruktosa a nivel de caracterización química, y es capaz de reorganizarse en agua formando nanopartículas, que, dependiendo el origen bacteriano, se sitúan entre 100 y 300 nm, y una carga superficial entre -4 y -1 mV; siendo consideradas estables durante

los primeros 15 días tras su síntesis. Las partículas obtenidas de *A. nectaris* muestran tamaños más pequeños y una mayor estabilidad que las obtenidas por *B. subtilis*. El peso molecular de estas cadenas de polifruktosa se sitúa en 1000 Da.

- Las cadenas de polifruktosa se reorganizan en agua, debido a su carácter anfifílico, a partir de cierta concentración, conocida como CAC, que en el caso de las nanopartículas obtenidas de forma microbiana adquiere un valor alrededor de 0.05 mg/mL. Estas partículas presentan un valor positivo del segundo coeficiente del virial, y una adsorción inespecífica de proteínas de un 12% en peso.
- Por otra parte, se adquirió la enzima aislada y purificada, y se estudió cómo ocurre la catálisis de este polímero en un sistema libre de células. Las cadenas de polifruktosa obtenidas muestran un peso molecular inferior (alrededor de 600 Da) y una concentración de agregación crítica superior (alrededor de 0.2 mg/mL). No hay diferencias significativas en relación con su naturaleza química.
- Las nanopartículas obtenidas presentan tamaños alrededor de 100 nm medidos en número, siendo estables durante los primeros 15 días tras su síntesis, y con una carga superficial alrededor de -2 mV. El valor del segundo coeficiente del virial para estas partículas es la mitad del obtenido para las producidas de forma microbiana, sugiriendo una menor estabilidad, y mayor interacción partícula-partícula, como prueba su valor de CAC.



- La caracterización completa de la reacción enzimática sugirió la temperatura óptima de reacción en el rango 35-40°C, siendo las partículas estables por debajo de 60°C.
- La sacarosa ejerce como un inhibidor en la catálisis enzimática en el proceso enzimático por la liberación del intermediario glucosa. Cuando otros azúcares, como glucosa o lactosa son liberados al medio, éstos ejercen un efecto inhibitorio que reduce la eficiencia de la catálisis.
- La velocidad de catálisis puede incrementarse con la adición de mayor cantidad de enzima. Un incremento en la proporción enzima-sustrato provoca también un aumento de peso molecular, que resulta interesante para reducir el valor de la CAC.
- La adición de ciertos elicitores como el ion manganeso o el ATP generan un incremento de la velocidad de producción. Además, en el caso del ATP provoca la aparición de cadenas de pesos moleculares mayores.
- La rafinosa también puede ser empleada como sustrato para la producción del polímero levan. La velocidad de producción es más alta que para el caso que usa sacarosa, y no se observa variación ni en el tamaño de partícula ni en la carga superficial. También genera cadenas de mayores pesos moleculares.
- Los resultados obtenidos en la catálisis enzimática han sido usados para construir un modelo matemático que explique de forma paralela, la síntesis del polímero y su proceso de auto-ensamblado

en agua. El modelo considera que el polímero producido dificulta estéricamente la actividad de la enzima, y que las reacciones de hidrólisis y transfructosilación siguen una cinética de Michaelis-Menten. Por otra parte, el proceso de auto-ensamblado se encuentra modelado asumiendo una agregación limitada por la difusión (DLCA) y utilizando una función escalón de Heaviside, con el valor de la CAC como valor crítico.

- Se estimaron los parámetros más importantes del modelo, tratando de ajustar los resultados experimentales a las ecuaciones planteadas en el mismo (utilizando la estimación basada en la máxima probabilidad). Para todos los casos, se obtiene una buena estimación, donde el peso de los residuales es inferior al valor de chi-cuadrado.
- La mayor limitación para la producción enzimática del polímero es el elevado coste de la enzima. Se diseñaron dos sistemas de inmovilización de la enzima, un reactor de lecho fijo con esferas de alginato, y un reactor monolítico; obteniéndose elevados rendimientos de inmovilización, sin comprometer la actividad enzimática. De igual forma, una vez se eluye la enzima del soporte, conserva cierta actividad residual.
- Se han definido las mejores condiciones de operación para cada sistema (porosidad, caudal, longitud de lecho, concentración de sustrato), y con los resultados experimentales, se ha formulado un modelo de transferencia de materia para ambos reactores. El modelo demuestra que el reactor monolítico presenta muy poca resistencia a la transferencia de materia, y las partículas obtenidas

desde él son muy semejantes a las obtenidas en un reactor de mezcla perfecta. El uso del reactor de lecho fijo permite obtener nanopartículas de diferentes tamaños, debido a los impedimentos difusionales que presenta.

- Para analizar la viabilidad económica de la inmovilización, se realizó un estudio tecno-económico simulando la puesta en marcha de dos plantas de producción de este polímero, cada una empleando un tipo de reactor. Los resultados muestran que tanto los costes de capital fijo como los costes anuales de producción son semejantes, reduciéndose mucho si se compara con la producción en un sistema con la enzima libre, en un reactor de mezcla perfecta (alrededor de un 25% menos de coste de materias primas).
- Una de las aplicaciones más importantes de estas nanopartículas es su uso como transportador de fármacos. Se inmovilizó el fármaco citostático 5-fluorouracilo con una capacidad de carga de 0.60%, y efecto terapéutico demostrado. Los ensayos *in vitro* en líneas tumorales de cáncer de mama y cáncer de colon demostraron que este sistema es un buen transportador con una liberación sostenida que permite crear un sistema de liberación controlada de fármaco. El tratamiento se ha visto mucho más efectivo para células tumorales de colon que para células tumorales de mama.
- El polímero levan se ha visto también efectivo para la creación de estructuras coloidales de plata que presenten efecto bacteriostático. El polímero actúa paralelamente como agente reductor y de bloqueo, y estas nanopartículas pueden ser introducidas en geles de alginato para aplicaciones tópicas de control bacteriano.

- Las nanopartículas obtenidas presentan un tamaño de 30-40 nm, con una carga superficial en torno a -20 mV. La relación dosis-respuesta muestra una mayor sensibilidad de las bacterias Gram negativas, pudiéndose reducir la supervivencia hasta el 20% en las primeras horas de exposición al gel.
- El proceso de liberación de las nanopartículas fue modelizado, así como el proceso de control bacteriano (efecto bacteriostático). Se estimaron los parámetros más importantes que demostraron que el proceso se encuentra controlado por la difusión, y sigue un modo de acción de impacto único / diana múltiple.
- La última aplicación destacable es su capacidad para recubrir prótesis de titanio-aluminio-vanadio, previniendo de la adhesión bacteriana. Los estudios de rayos X mostraron una disposición cristalina alrededor de la prótesis, así como una distribución homogénea al ser observados por microscopía electrónica. Los ensayos de adhesión microbiana mostraron la escasa presencia de colonias de *Staphylococcus*, demostrando la no-adhesión bacteriana a la prótesis.





# **Capítulo 10**

---

## **Bibliografía**





Abdel-Fattah A.M., Garnal-Eldeen A.M., Helmy W.A., Esawy M.A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. Carbohydr Polym 89 (2012), 314-322.

Ackerknecht E. A short story of medicine: revised and expanded Edition. John Hopkins University Press. Baltimore. 2016.

Adamberg K., Tomson K., Talve T., Pudova K., Puurand M., Visnapun T., Alamäe T., Adamberg S. Levan enhances associated Growth of Bacteroides, Escherichia, Streptococcus and Faecalibacterium in Fecal Microbiota. Plos One 10/12/e0144042 (2015).

Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. J Pharm Sci 92 (2003), 343-355.

Adrio J.L., Demain A.L. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng Bugs 1 (2010), 116-131.

Ahmed K.B.A., Kalla D., Uppuluri K.B., Anbazhagan V. Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. Carbohydr Polym 112 (2014), 539-545.

Alford J.R., Kendrick B.S., Carpenter J.F., Randolph T.W. Measurement of the second osmotic virial coefficient for protein solutions exhibiting monomer-dimer equilibrium. Anal. Biochem. 377 (2008), 128-133.

Álvarez-Pérez S., Lievens B., Jacquemyn H., Herrera C.M. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov.

isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (2013), 1532-1539.

Ammar Y.B., Matsubara T., Ito K., Iizuka M., Limpaseni T., Pongsawasdi P., Minamiura N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J Biotechnology* 99 (2002), 111-119.

Arrieta J.G., Sotolongo M., Menéndez C., Alfonso D., Trujillo L.E., Soto M., Ramírez R., Hernández L. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus* J. *Bacteriol.* 186 (2004), 5031–5039.

Barclay T.G., Rajapaksha H., Thilagam A., Qian G., Ginic-Markovic M., Cooper P.D., Gerson A., Petrovsky N. *Carbohydr. Polym.* 143 (2016), 108-115.

Barone J.R., Medunets M. Thermally processed levan polymers. *Carbohydr Polym* 69 (2007), 554-561.

Bekers M., Upite D., Kaminska E., Laukevics J., Grube M., Vigants A., et al. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.* 40 (2005), 1535–1539.

Benigar E., Valant A.Z., Dogsa I., Sretenovic S., Stopar D., Jamnik A., Tomsic M. Structure and dynamics of a model polymer mixture mimicking a levan-based bacterial biofilm of *Bacillus subtilis*. *Langmuir* 32 (2016), 8182-8194.

Bersaneti G.T., Caldas Pan N., Baldo C., Celligoi M.A.P. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by levansucrase from *Bacillus subtilis natto* with Potential Application in the Food Industry. *App Biochem Biotechnol* 184 (2018), 838-851.

Berthiaume F., Maguire T., Yarmush M.L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng* 2 (2011), 403-430.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control Release* 235 (2016), 337-351.

Biotechnology market Size by Application. *Global Market Insights* 2017.

Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Third, enlarged and improved Edition. Wiley. 2017.

Blandino A., Macías M., Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and  $\text{CaCl}_2$  concentration on gelation kinetics. *J. Biosci. Bioeng.* 88 (1999), 686-689.

Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008), 2892-2923.

Boateng J.S., Catanzo O. Advances therapeutic dressings for effective wound healing. A review. *J. Pharm. Sci.* 104 (2015), 3653-3680.

Bondarenko O.M., Ivask A., Kahru A., Vija H., Titma T., Visnapuu M., Joost U., Pudova K., Adamberg S., Visnapuu T., Alamäe T. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating

material for microelement-nanoparticles. *Carbohydr Polym* 136 (2016), 710-720.

Boyd A., Chakrabarty A.M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolisaccharide. *J Ind Microbiol* 15 (1995), 162-168.

Bracht K., Nicholls A.M., Liu Y., Bodmer W.F. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *British Journal of Cancer* 103 (2010), 340-346.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality WorldWide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 68 (2018): 394-424.

Brook R.J., Arnold G.C. *Applied Regression Analysis and Experimental Design*. 1985. CRC Press, 48-49. ISBN: 0824772520.

Calazans G.M.T., Lima R.C., de França F.P., Lopes C.E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int J Biol Macromol* 27 (2000), 245-247.

Chai Y., Mei L.H., Wu G.L., Lin D.Q., Yao S.J. Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004), 228-233.

Chambert R., Gonzy-Treboul G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic Aspects of Transfructosylation Process. *Eur J Biochem* 62 (1976), 55-64.

Chambert R., Treboul G., Dedonder R. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. European Journal of Biochemistry 41 (1974), 235-300.

Chen X., Gao H., Ploehn H.J. Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. Carbohydr Polym 101 (2014), 565-573.

Chiang C.J., Wang J.Y., Chen P.T., Chao Y.P. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82 (2009), 445-451.

Chik N., Wan W.S., Zain Md, Mohamad A.J., Sidek M.Z., Wan Ibrahim W.H., Reif A., Rakebrandt J.H., Pfleging W., Liu X. Bacterial Adhesion on the Titanium and Stainless-Steel Surfaces Undergone Two Different Treatment Methods: Polishing and Ultrafast Laser Treatment. IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng 358 (2018), 012034.

Cote G.L., Imam S.H. Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. Carbohydr Res 190 (1989), 299-307.

Coulson J.M., Richardson J.F., Sinnott R.K. Chemical Engineering (Volume 6: Chemical Engineering Design). 4<sup>Th</sup> edition, Elsevier, Oxford, 2005.

Crutz A.M., Steinmetz M., Aymerich S., Richter R., Le Coq D. Induction of Levansucrase in *Bacillus subtilis*: an Antitermination Mechanism Negatively Controlled by the Phosphotransferase System. J Bacteriol 172 (1990), 1043-1050.

Dahech I., Harrabi B., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belghith H., Belghith K.S. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *Int J Biol Macromol* 58 (2013), 281-286.

Dan A., Soumen G., Moulik S. Physicochemical studies on the Biopolymer inulin: A critical evaluation of its Self-Aggregation, Aggregate-Morphology, Interaction with Water and Thermal Stability. *Biopolymers* 91 (2009), 687-699.

Demir Sezer A., Kazak H., Öner E.T., Akbuga J. Levan-based nanocarrier for peptide and protein drug delivery optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticles characteristics. *Carbohydr Polym* 84 (2011), 358-363.

Demir Sezer A., Sarilmiser K., Rayaman E., Cevikbas A., Öner E.T., Akbuga J. Development and characterization of vancomycin-loaded levan based microparticulate system for drug delivery. *Pharm Dev Technol* 25 (2015), 1-8.

de Oliveira M.R., da Silva S. R.S.S.F. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem Eng J* 37 (2007), 177-193.

Doig S.D., Pickering S.C.R., Lye G.J., Baganz F. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005), 2741-2750.

Dong C.X., Zhang L.J., Xu R., Zhang G., Zhou Y.B., Han X.Q., Zhang Y., Sun Y.X. Structural characterization and immunostimulating

activity of a levan-type fructan from *Curcuma kwangsiensis*. Int J Biol Macromol 77 (2015), 99-104.

Donot F., Fontana A., Baccon J., Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym 87(2012), 951-952.

Dunbar C.E., High K.A., Joung J.K., Kohn D.B., Ozawa K., Sadelain M. Gene therapy comes of age. Science 359 (2018), 175.

Elorza M.V., Villanueva J.R., Sentandre R. The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Acta 475 (1977), 103-112.

Elviro M., Vega M., Martín del Valle E., Galán M.A. Preparation and characterization of a macroporous agarose monolith as a stationary phase in IMAC chromatography. Chem. Eng. Commun. 206 (2019), 268-267.

Erginer M., Akcay A., Coskuncan, B., Morova T., Rende D., Bucak S., Baysal N., Ozisik R., Eroglu M.S., Agirbasly M., Öner E.T. Sulfated levan from *Halomonas smyrnensis* as a bioactive, heparin-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications. Carbohydr Polym 149 (2016), 289-296.

Erikson B. Industrial Biotechnology reaches a Milestone: A Decade of Business Growth and Environmental Solutions. Industrial Biotechnology 13 (2017), 98-100.

Esawy M.A., Amer H., Gamal-Eldeen A.M., El Enshasy H.A., Helmy W.A., Abozeid M.A.M., Malek R., Ahmed E.F., Awad G.E.A. Scaling

up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydr Polym* 95 (2013), 578-587.

Eun-Kyung J., Jang K-H., Koh I., Kim I-H., Kim S-H., Kang SAH., Kim C.H., Ha S-D., Rhee S-K. J. Molecular characterization of the Levansucrase Gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherichia coli*. *Microbiol. Biotechnol.* 12 (2002), 603–609.

European Comission. White Paper. The future of Health Care: deep data, smart sensors, virtual patients and the Internet-of-Humans. May 2016.

Franken J., Brandt B.A., Tai S.L., Bauer F.F. Biosynthesis of Levan, a Bacterial Extracellular Polysaccharide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* 8 (2013), e77499.

Freitas F., Alves V.D., Reis M.A. Advances in bacterial exopolisaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 29 (2011), 388-398.

García-Ochoa F., Santos V.E., Casas J.A., Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* 18 (2000), 549-579.

Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shoham, G., Danino, D., Shoham, Y. Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 32209-32217.



Gomaa E.Z. Production of PHA by *Bacillus subtilis* and *E. coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. Braz Arch Biol Technol 57 (2014), 1.

gPROMS Advanced User Guide: Process System Enterprise, Ltd: London, UK, 2004: p.37.

Grube M., Bekers M., Upite D., Kaminska E. Infrared spectra of some fructans. Spectroscopy 16 (2002), 289-296.

Gupta S.K., Pal A.K., Sahu N.P., Dalvi R.S., Akhtar M.S., Jha A.K., Baruah S.K. Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. Aquaculture 306 (2010), 398–402.

Hadrup N., Sharma A.K., Loeschner K. Toxicity of silver ions, metallic silver and silver nanoparticles materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. Regul. Toxicol. Pharmacol 98 (2018), 257-267.

Hasheminya S.M., Dehghannya J. An overview on production and applications of gellan biopolymer. Intl J Agri Crop Sci 5 (2013), 3016-3019.

He C., Yang Y., Zhao R., Qu J., Jin L., Lu L., Xu L., Xiao M. Rational designed mutagenesis of levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 for product specificity study. Appl Microbiol Biotechnol 102 (2018), 3217-3228.

Hestrin S., Avineri-Shapiro S., Aschner M. The enzymic production of Levan. Biochemical Journal 37 (1943), 450.

Hill A., Karboune S., Mateo C. Immobilization and stabilization of levansucrase biocatalyst of high interest for the production of fructooligosaccharides and levan. *J Chem Technol Biotechnol* 91 (2016), 2440-2448.

Hoshyar N., Gray S., Han H., Bao G. The effect of nanoparticles size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* 11(2016), 673-692.

Hu J., Li Y., Zhang Y., Dong-Jun Y. ATP-bind: Accurate Protein-ATP Binding Site Prediction by Combining Sequence-profiling and Structure Based Comparisons. *J Chem Information and Modeling* 58 (2018), 501-510.

Ing-Lung S., Tsaor-Chin W., Shou-Zoo C., Gen-Der L. Sequential production of two biopolymers-levan and poly-e-lysine by microbial fermentation. *Bioresour Technol* 102 (2011), 3966-3969.

Ing-Lung S., Yun-Ti Y., Chwen-Jen S., Chien-Yan H. Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J Agric Food Chem* 53 (2005), 8211-8215.

Israili Z.H. Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* 21 (2014), 304-323.

Jathore N.R., Bule M.V., Tilay A.V., Annapure U.S. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Sci Biotechnol* 21 (2012), 1045-1053.

Jang K.H., Song K.B., Kim J.S., Kim C.H., Chung B.H., Ree S.K. Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 23 (2000), 89-93.

Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16 (1999), 185-193.

Kalluri R.R., Cahela D.R., Tatarchuk B.J. Comparative heterogeneous contacting efficiency in fixed bed reactors: opportunities for new microstructured systems. *Appl. Catal. B* 90(2009), 507-515.

Kalyanasundaram G.T., Doble M., Gummadi S.N. Production and downstream processing of (1-3)  $\beta$ -D-glucan from mutant strain of *Agrobacterium* sp. ATCC 31750. *AMB Express* 2(2012), 31.

Kang H.K., Yun S.I., Lim T.Y., Xia Y.M., Kim D. Cloning of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and its expression in *Pichia pastoris*. *Food Sci. Biotech.* 20 (2011), 277-281.

Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent. Mater* 16 (2000), 452-455.

Kekez B., Gojgic-Cvijovic G., Jakovljevic D., Pavlovic V., Beskoski V., Popovic A., Vrvic M.M., Nikolic V. Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. *Carbohydr. Polym* 154 (2016), 20-29.

Kim S.J., Baem P.K., Chung B.H. Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chem Commun* 51 (2015), 107-110.

Kim S.J., Chung B.Y. Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. *Carbohydr Polym* 150 (2016), 400-407.

Kostic D., Vidovic S., Obradovic B. Silver release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels in the presence of chloride ions: experimental results and mathematical modelling. *J Nanopart. Res.* 18 (2016), 76.

Lapcik L.Jr., Lapcik L., De Smedt S., Demeester J., Chabreck P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties and Applications. *Chemical Reviews* 98 (1998), 8.

Lavorgna M., Attianese I., Buonocore G., Conte A., del Nobile M., Tescione F., Amendola E. MTT-supported Ag nanoparticles for chitosan nanocomposites: Structural properties and antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 102 (2014), 385-392.

Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 37 (2012), 106-126.

Le Gorrec K., Connes C., Guibert A., Uribe Larrea J.L., Combes D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002), 44-52.

Leibovici J., Kopel S., Siegal A., Gal-Mor O. Effect of tumor inhibitory and stimulatory doses of levan, alone and in combination with cyclophosphamide, on spleen and lymph nodes. *Int J Immunopharmacol* 8 (1986), 391-403.

Lendlein A. Polymers in Biomedicine. *Macromol Biosci* 10 (2010), 993-997.

Li, N., Zhao L., Qi, L., Li, Z., Luan Y. Polymer assembly: Promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy. *Progress in Polymer Science* 58 (2016), 1-26.

Li R., Zhang T., Jiang B., Mu W., Miao M. Purification and characterization of an intracellular levansucrase derived from *Bacillus methlotrophicus* SK 21.002. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 62 (2015), 815-822.

Linde D., Rodríguez-Colinas B., Estévez M., Poveda A., Plou F.J., Fernández-Lobato M. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource technology* 109 (2012), 123-130.

Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour Technol* 101 (2010), 5528-5533.

Liu J., Luo J., Ye H., Zeng, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem Toxicol* 50 (2012), 767-772.

Liu L., Liu Y., Li J. Du, G., Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact* 10 (2011), 99.

Liu W.Y., Zhang K.J. Electrochemical Experiment Investigation on Behaviour and Mode of the Interaction between DNA and (S)-2-(5-fluorouracil-1-Acetyl) Amido-1,4-Succinic acid. *Int J Electrochem Sci* 6 (2011), 1066-1074.

Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C.H., Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 60 (2008), 1650-1662.

Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3 (2003), 330-338.

Lu Y. Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world. *Synth Syst Biotechnol.* 2 (2017), 23-27.

Luedeking R., Piret E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Tech Eng* 1 (1959), 393.

Maine E., Thomas V.J., Bliemel M., Murira A., Utterback J. The emergence of nanobiotechnology industry. *Nat Nanotechnol* 9 (2014), 2-5.

Maitz M.F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* 1 (2015), 161-176.

Malten M., Biedendieck R., Gamer M., Drews A.C., Stammen S., Buchholz K., Dijkhuizen L., Jahn D. A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, Export, and One-Step Purification of Affinity-Tagged Heterologous Levansucrase from Growth Medium. *App. Envir. Microb.* 72 (2006), 1677-1679.

Marchessault R.H., Liang C.Y. The infrared spectra of crystalline polysaccharides. *J Polym Sci* 59 (1962), 357-378.

Markowiak P., Slizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 9 (2017), 1021.

Marques Gonsalves B.C., Baldo C., Colabone Celligoi M.A.P. Levan and levansucrases: A mini Review. *Int J Scientific and Technology Research* 4 (2015), 100-104.

Martín del Valle E.M., Galán M.A., Carbonell R.G. Drug delivery technologies: the way forward in the new decade. *Ind Eng Chem Res* 48 (2009), 2475-2486.

Martinez-Fleites C., Ortiz-Lombardia M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor E.J., Arrieta J.G., Hernández L., Davies G.J. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390 (2005), 19–27.

Méndez-Lorenzo L., Porras-Domínguez J.R., Raga-Carbajal E., Olvera C., Rodríguez-Alegría M.E., Carrillo-Nava E., Costas M., López-Munguía A., Intrinsic Levansucrase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *Plos One* 10(2015), e0143394.

Menéndez C., Banguela A., Caballero-Mellado J., Hernández L. Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 1782–1785.

Meng G., Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrases *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003), 935–941.

Molina Grima E., Belarbi E.H., Acien Fernández F.G., Robles Medina A., Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20 (2003), 491-515.

Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol* 3 (1949), 371.

Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol* 6 (2015), 1-11.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1983), 55-63.

Mukherjee A., Banerjee S., Gachhui R. Investigation of conformational changes of levansucrase isolated from *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1 by mercuric and cadmium ion. *Int J Biol Macromol* 120 (2018), 189-194.

Naumoff DG. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional  $\beta$ -xylosidases and  $\alpha$ -l-arabinases *FEBS Lett* 448 (1999), 177-179.

Navarro M., Michiardi A., Castaño O., Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* 5 (2008), 1137-1158.

Neale G.H., Nader W.K. Prediction of transport processes within porous media: diffusive flow processes within an homogeneous swarm of spherical particles. *Aiche J.* 19 (1973), 112-119.

Ni D., Xu W., Bai Y., Zhang W., Zhang T., Mu W. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from



*Lactobacillus reuteri* LTH 5448. Int. J. Biol. Macromol. 113 (2018), 29-37.

Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. Int J Mol Sci 13 (2012), 14002-14015.

Öner E.T., Hernández L., Combie J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. Biotech Adv 34 (2016), 824-844.

Osman A., Öner E.T., Eroglu M.S. Novel levan and pNIPA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release. Carbohydr Polym 165 (2017), 61-70.

Palaniraj A., Jayaraman V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. J Food Eng 106 (2011), 1-12.

Peppas N., Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems.

Pieper S., Onayufe H., Mulac D., Cinatl J., Wass M.N., Michaelis M., Langer K. Incorporation of doxorubicin in different polymer nanoparticles and their anti-cancer activity. BioRxiv 2018, in press.

Poli A., Kazak H., Gürleyendag B., Tommonaro G., Pieretti G., Oner E.T., Nicolaus B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. Carbohydr Polym 78 (2009), 651-657.

Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009),1641–1650.

Quigley A., Williams D.R. The second virial coefficient as a predictor of protein aggregation propensity: A self-interaction chromatography study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015), 282-290.

Raga-Carbajal E., Carrillo-Nava E., Costas M., Porras-Domínguez J., López-Munguía A., Olvera C. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology* 26 (2016), 377-385.

Reese E.T., Avigad G. Purification of levansucrase by precipitation with levan. *Biochim. Biophys. Acta* 113 (1966), 79-83.

Rehm B.H. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010), 578-592.

Rehm B.H. Microbial production of biopolymers and polymer precursors. Applications and perspectives. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press. 2009

Renuart E., Viney C. Biological fibrous materials: self-assembled structures and optimised properties. In: Elices M, ed. Structural biological materials. Oxford: Pergamon/Elsevier Science (2000), 221–267.

Ribeiro M., Monteiro F.J., Ferraz M.P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter* 2 (2012), 176-194.

Saeb A.T.M., Alshammari A.S., Al-Brahim H., Al-Rubeaan K.A. Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria. *Sci. World J.* 2014 (2014), 704708.

Santos-Moriano P., Fernández-Arrojo L., Poveda A. Jiménez-Barbero J., Ballesteros A.O. Plou F.J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Effect of reaction conditions. *J Mol Catal B-Enz* 119 (2015), 18-25.

Sarilmiser H.K., Öner E.T. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6t. *Biochem Eng J* 92 (2014), 28-34.

Schmid J., Sieber V., Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* 6(2015), 496.

Sella S.R.B.R., Vanderberghe L.P.S., Soccol C.R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications: a review. *Crit Rev Biotechnol* 1 (2014), 13.

Sethi S., Wiesner M.R. Cost modeling and estimation of crossflow membrane filtration processes. *Environ. Eng. Sci.* 17 (2000), 61-79.

Shih L., Yu Y.T. Simultaneous and selective production of Levan and poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology letters* 27 (2005), 103-106.

Shih L.I., Chen L.D., Wang T.C., Wu J.Y., Liaw K.S. Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chem.* 12 (2010), 1242-1247.

Senthilkumar V., Gunasekaran P. Bioethanol production from cellulosic substrates: engineered bacteria and process integration challenges. *J Sci Ind Res* 64 (2005), 845-853.

Sprenger N., Bortlik K., Brandt A., Boller T., Wiemken A. Purification, cloning, and functional expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *PNAS* 92(1995), 11652-11656.

Srikanth R., Siddartha G., Reddy C.H.S.S., Ramaiah H.B.S.M.J. Uppuluri K.B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym* 123 (2015), 8-16.

Srikanth S., Sundhar Reddy C.H.S.S., Siddartha G., Ramaiah M.J., Babu Uppulum K. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym* 120 (2015), 102-114.

Stengel D.B., Connan S. Chapter: Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications at Book: Natural Products from Marine Algae, methods and protocols. Editorial Springer New York. 2015.

Stivala S.S., Bahary N.S., Save-diluted-solution parameters of the levan of *Streptococcus salivarius* in various solvents. *Carbohyd Research* 67 (1978), 17-21.

Strube C.P., Homann A., Gamer M., Jahn D., Seibel J.D., Heinz D.W. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs J. Biol. Chem. 286 (2011), 17593–17600.

Subathra Devi C., Reddy S., Mohanasrinivasan V. Fermentative production of dextran using *Leuconostoc* spp. Isolated from fermented food products. Front. Biol 9 (2014), 244.

Szakács G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. Nature Reviews Drug Discovery 5 (2006), 219-234.

Szwengiel A., Goderska K., Gumienna M. Synthesis of B(2-6)-linked fructan with a partially purified levansucrase from *Bacillus subtilis*. J Mol Catal B-Enz 131 (2016), 1-9.

Tabernero A., Baldino L., González-Garcinuño A., Cardea S., Martín del Valle E., Reverchon E. Supercritical CO<sub>2</sub> assisted formation of composite membranes containing an amphiphilic fructose-based polymer. J. CO<sub>2</sub> Util. 34 (2019), 274-281.

Taglietti A., Fernández Y.A.D., Amato E., Cucca L., Dacamo G., Grisoli P., Necchi V., Pallavicini P., Pasotti L., Patrini M. Antibacterial Activity of Glutathione-coated Silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative Bacteria. Langmuir 28 (2012), 8140-8148.

Thanvin C., Schwarz B., Delie F., Allémann E. Functionalized PLA polymers to control loading and for release properties of drug-loaded nanoparticles. Int J Pharmaceutics 548 (2018), 771-777.

Tian F., Karboune S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. *J Mol Cat B: Enzymatic* 82 (2012), 71-79.

Trampuz A., Osmon D.R., Hanssen A.D., Steckelberg J.M., Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin. Orthop. Relat. Res* 414 (2003), 69-88.

Tronconi E., Forzatti P. Adequacy of lumped parameter models for SCR reactors with monolith structure. *Aiche J.* 38 (1992), 201-210.

Tsipa A., Koutinas M., Usaku C., Mantalaris A. Optimal bioprocess design through a gene regulatory network – Growth kinetic hybrid model: Towards replacing Monod kinetics. *Metab. Eng* 48 (2018), 129-137.

Ua-Arak T., Jakob F., Vogel R.F. Fermentation pH modulates the size distributions and functional properties of *Gluconobacter albidus* TMW2.1191 levan. *Front Microbiol* 8 (2017), 807.

Ullrich M. Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends. Norfolk UK: Horizon Scientific Press. 2009.

Uramoto K., Takahashi R., Terao K., Sato T. Local and global conformations of flower micelles and flower necklaces formed by an amphiphilic alternating copolymer in aqueous solution. *Polymer Journal* 48 (2016), 863-867.

Urely B.D., Nair L.S., Laurencin C.T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci B Polym Phys* 49 (2011), 832-864.

Vaisocherova H., Yang W., Zhang Z., Cao Z., Cheng G., Piliarik M., Homola J., Jian S. Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma. *Anal Chem* 80 (2008), 7894-7901.

Velazquez-Hernandes M.L., Baizabal-Aguirre V.M., Bravo-Patiño A., Cajero-Juárez M., Chávez-Moctezuma M.P., Valdez-Alarcón J.J. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J Appl Microbiol* 106 (2009), 1763-1778.

Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K.H., Kim S.K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int J Biol Macromol* 72 (2015), 269-281.

Venugopal V. Marine polysaccharides: Food applications. Florida, USA, CRC Press. 2011.

Vián Ortuño A. El pronóstico económico en química industria. 4Th edition. Eudema. España, 1991.

Vigants A., Hicke H.G., Marx S.P. A simple and efficient method for the purification of Membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr Microbiol* 42 (2001), 415-418.

Vigants A., Marx S.P., Linde R., Ore S., Bekers M., Vina I., Hicke H.G. A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase. *Curr Microbiol* 47 (2003), 198-202.

Vina I, Karsakevich A, Gonta S, Linde R, Bekers M. Influence of some physicochemical factors on the viscosity of aqueous levan solutions of *Zymomonas mobilis*. *Acta Biotechnologica* 18 (1998), 167-174.

Vysotskii V.V., Uryupina O.Y., Gusel'nikova A.V., Roldugin V.I. On the Feasibility of Determining Nanoparticle Concentration by the Dynamic Light Scattering Method. *Colloid Journal* 71 (2009), 739-744.

Wang D., Chen F., Wei G., Jiang M., Dong M. The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym* 127 (2015), 325-331.

Wang Y., Winnik M.A. Onset of aggregation for water-soluble polymeric associative thickeners: a fluorescence study. *Langmuir* 6 (1990), 1437-1439.

Whitaker E.J., Edwards J.R. Purification and properties of a cell-associated levan-sucrase from *Streptococcus salivarius* SS2. *Archives of Oral Biology* 21 (1976), 565-570.

Wilding K.M., Schinn S.M., Long E.A., Bundy B.C. The emerging impact of cell-free chemical biosynthesis. *Curr Opin Biotech* 53 (2018), 115-121.

Wilhelm M., Zhao C., Wang Y., Xu R., Winnik M.A., Mura J.L., Riess G., Croucher M.D. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules* 24 (1991), 1033-1040.

Wong M., Hollinger J., Jozycz L.M., McCormick T.M., Lu Y., Burns D.C., Seferos D.S. An Apparent Size-Exclusion Quantification Limit



Reveals a Molecular Weight Limit in the Synthesis of Externally Initiated Polythiophenes. *ACS Macro Lett* 1 (2012), 1266-1269.

Wuerges J., Caputi L., Cianci M., Boivin S., Meijers R., Benin S. The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site *J. Struct. Biol.* 191 (2015), 290–298.

Wysocki B., Maj P., Sitek R., Buhagiar J., Kurzydowski K.J., Swieszkowski W. Laser and Electron Beam Additive Manufacturing Methods of Fabricating Titanium Bone Implants. *Appl. Sci.* 7 (2017), 657.

Xabier J.R., Ramana K.V. Optimization of Levan production by cold-active *Bacillus licheniformis* ANT179 and Fructooligosaccharide Synthesis by its Levansucrase. *App Biochem Biotech* 181 (2017), 986-1006.

Xu X., Gao C., Liu Z., Wu J., Han J., Yan M., Wu Z. Characterization of the levan produced by *Paenibacillus bovis* sp. nov BD3526 and its immunological activity. *Carbohydr Polym* 144 (2016), 178-186.

Yadav P., Yadav H., Shah V.G., Shah G., Dhaka G. Biomedical Biopolymers, their origin and evolution in Biomedical Science: A Systematic Review. *J Clin Diagn Research* 9 (2015), 21-25.

Yang Y., Galle S., Le M.H.A., Zijlstra R.T., Gänzle M.G. Feed fermentation with reuteran and levan-producing *Lactobacillus reuteri* reduces Colonization of Weanling Pigs by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 81 (2015), 5743-5752.

Yang Y., Zhao X., Le M.H.A., Zijlstra R.T., Gänzle M.G. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front Microbiol* 6 (2015), 762.

Yildirim A., Ozgur E., Bayindir M. Impact of mesoporous silica nanoparticles functionality and hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption. *J Mater Chem* 1 (2013), 1909-1920.

Yoon E.J., Yoo S.H., Cha J., Lee H.G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int J Biol Macromol* 34 (2004), 191-194.

Yoshikawa H., Hirano A., Arakawa T., Shiraki K. Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012), 1286-1291.

Yu X., Li L., Zhang J., Shen Z., Zhu C., Wang P., Jiang X. Structural analysis of macromolecular levan produced by *Bacillus megaterium* GJT321 based on enzymatic method. *Int J Biol Macromol* 93 (2016), 1080-1089.

Yu T., Xiong Z., Chen S., Tu G. The use of models in “target” theory to evaluate the survival curves of human ovarian carcinoma cell line exposure to Andriamycin combined with ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 12 (2005), 345-348.

Zilberman M., Elsner J.J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control Release* 130 (2008), 202-215.





**Resultados de la  
estancia de  
investigación en el  
grupo BSEL  
(Imperial College London)**

---

**SUPERVISOR: Prof. Athanasios Mantalaris**



## 1. ANTECEDENTES

El diseño de modelos para explicar diferentes procesos es uno de los campos que más está creciendo en los últimos años en la Ingeniería bioquímica. La creación de estos modelos permite reducir la experimentación en muchos casos, así como proporciona un mayor control de los procesos y los productos que se obtienen. El grupo BSEL (Biological Systems Engineering Laboratory), dirigido por el prof. Athanasios Mantalaris es parte del Centro de Investigación en Process Systems Engineering (PSE) situado en el Imperial College de Londres. Este grupo ha trabajado durante los últimos 15 años en la creación y validación de modelos que expliquen diferentes fenómenos biológicos de importancia para la sociedad. Concretamente, ha centrado su trabajo en la mejora de la producción de anticuerpos monoclonales a partir de células de mamífero, modelando tanto el metabolismo de la producción como el control de las plantas que lo producen; así como en la generación de sangre artificial o soportes para el tratamiento de la leucemia, tratando de validar experimentalmente los modelos propuestos de generación sanguínea y de adhesión celular de las células del torrente sanguíneo a diferentes soportes.

El grupo de investigación del doctorando (ABIQ), ya ha mantenido algunas colaboraciones previas con el grupo BSEL, y debido a los objetivos de investigación de esta tesis doctoral, así como a los intereses de investigación futura del grupo de investigación ABIQ, se planteó la realización de la estancia, con el fin de adquirir el conocimiento necesario por parte del doctorando, en los softwares más

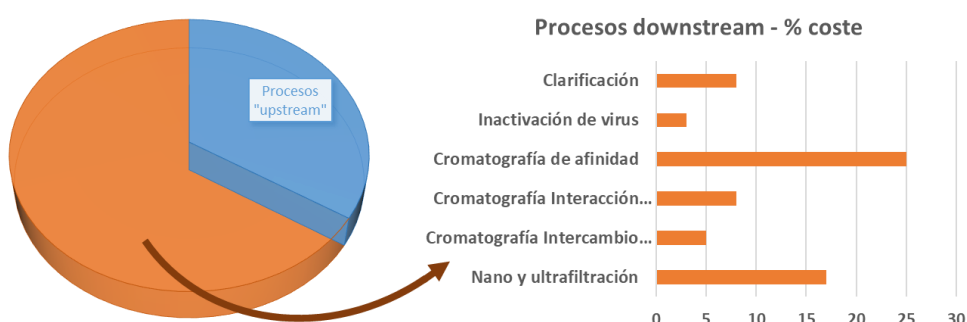
usados para estos fines, así como reforzar la relación colaborativa entre los grupos. La estancia de investigación tuvo lugar entre los meses de junio a septiembre del año 2017. Durante la estancia se adquirieron los conocimientos de manejo y funcionamiento del software gPROMS, que ha sido utilizado posteriormente en la tesis doctoral para la formulación de diferentes modelos matemáticos. Concretamente, se utilizó dicho software para el modelado y optimización del proceso de purificación de anticuerpos monoclonales por cromatografía, dentro del proyecto europeo *ModLife*, de la convocatoria H2020 Marie Curie ITN. En las siguientes líneas se expone un resumen de los resultados obtenidos, y se adjunta a continuación la publicación que está siendo revisada para su publicación en la revista: *Industrial and Engineering Chemistry Research*, fruto del trabajo realizado en la estancia.

## **2. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

El mercado de los anticuerpos monoclonales (mABs) ha crecido considerablemente en los últimos años, y muchas de sus patentes están próximas a expirar en los próximos años (1). La aparición de los biosimilares (aquellos fármacos biotecnológicos que están formados por la/s misma/s proteínas o componentes que aquellos protegidos por patente) aumenta la competitividad en el sector, que deja de estar protegido en cuanto a su propiedad intelectual y hace necesaria la mejora de los procesos para reducir el tiempo que pasa entre que un fármaco es diseñado y alcanza el mercado. Una de las etapas más limitantes en cuanto a la producción de estas proteínas terapéuticas es el elevado coste



que suponen los procesos de purificación en la mayoría de los casos. Para los anticuerpos monoclonales se estima que se encuentra entre el 50-80% de los gastos (ver referencias 4 y 5 en el artículo). En la figura siguiente, se presenta el % de coste que conllevan los procesos *upstream* y *downstream* en la producción de mABs, según la revista industrial: Biopharm Internacional ([www.biopharminternacional.com](http://www.biopharminternacional.com)).



### Diagrama de costes de producción de las diferentes operaciones unitarias en una planta de producción de mABs.

Debido a su alta resolución y selectividad, la cromatografía es obligatoria en los procesos de purificación debido al elevado grado de pureza que necesitan estos compuestos para ser administrados. Concretamente, hay tres tipos de cromatografía que son los más usados para la purificación de anticuerpos monoclonales: la cromatografía de afinidad utilizando proteína-A, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica. En la mayoría de los procesos son necesarias las tres, organizadas secuencialmente, para cumplir con los criterios impuestos por la FDA. Como se deduce de la

imagen anterior, son también las responsables de al menos el 35% de los costes totales de producción de mABs.

En la bibliografía se encuentran algunos modelos que consideran los procesos de adsorción y transferencia de materia, pero no tienen en cuenta la fluido-dinámica del proceso en las columnas, y de igual forma, la integración de los tres tipos de columnas distintos, para alcanzar el resultado óptimo. Estas son las dos principales ventajas que ofrece este modelo, por un lado, la integración de tres procesos diferentes de purificación cromatográfica; y, por otro lado, la incorporación de un modelo de movimiento del fluido a cada una de las columnas involucradas.

### 3. DISEÑO DEL MODELO

El modelo fue planteado para poder ser aplicado en dos escalas diferentes: una escala pequeña (de laboratorio) y una escala grande (a nivel industrial). El modelo busca predecir también los problemas asociados al cambio de escala, que son inherentes a cualquier proceso.

En cuanto a la modelización del fluido que recorre las columnas, en ambas escalas fueron considerados lechos empaquetados donde la pérdida de carga venía marcada por la ecuación de Ergun. Sin embargo, la velocidad que incluye esta ecuación no es la real, porque desprecia los efectos de pared que han de ser considerados en el caso de la escala de laboratorio, empleando la ecuación de Hazen-Williams, y asumiendo un flujo laminar.

En cuanto a la modelización de las diferentes sustancias involucradas en el proceso, el modelo considera la proteína diana (el anticuerpo monoclonal) así como 7 tipos diferentes de impurezas, que representan más del 99% de las impurezas que han de ser eliminadas durante el proceso de purificación. La transferencia de materia es evaluada tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria utilizando números adimensionales. Para cada una de las columnas, se emplearon las cinéticas de adsorción, intercambio que le son propias. En el caso de la cromatografía de afinidad se distinguieron tres etapas o fases: adsorción, lavado y elución; mientras que en las otras dos es un proceso en continuo, donde la desorción o intercambio ocurre por la variación de un gradiente de pH y concentración de sal (en el caso del intercambio

iónico) o de sal exclusivamente (en el caso de la interacción hidrofóbica). Este gradiente que varía con el tiempo es responsable de los cambios en las cargas superficiales de las impurezas y la proteína, así como en su grado de hidrofobicidad (calculado desde los aminoácidos expuestos en su superficie). Estos valores también son calculados por el modelo, y varían dependiendo el anticuerpo monoclonal usado. Para conseguir un modelo de amplio rango de actuación, el modelo ha sido validado con 14 anticuerpos diferentes, que cubren más del 70% del mercado actual de estos productos.

Para conseguir una aproximación real al fenómeno que ocurre en el interior de las columnas, estas se discretizaron en pequeños fragmentos infinitesimales, que permiten conocer los gradientes a lo largo del eje axial de la columna. La estrategia empleada supone cálculos cada 1 cm para la columna de afinidad, y cada 1 mm para los otros dos casos. Las condiciones de contorno empleadas son las definidas por Robin para los balances de materia (ver referencia 36) y por Neumann para la fluido-dinámica (ver referencia 37). El modelo realiza varias suposiciones, necesarias para poder ser resuelto, que pueden consultarse en la sección 2.1.7. del artículo.

El modelo se escribió y simuló en gPROMS 4.2.0 (PSE, UK) y fue ejecutado en un ordenador de 3.4 GHz con 16 GB de memoria RAM. Con el criterio seguido para la discretización, se obtuvieron: En el caso de pequeña escala, se tenían 25133 ecuaciones, de las cuales 12729 eran algebraicas y 12404 diferenciales, necesitando 62 segundos para ser ejecutado por completo. En el caso de la gran escala, se tenían 37406

ecuaciones, de las cuales 16834 eran algebraicas y 20572 diferenciales, necesitando 924 segundos para ejecutarse por completo. En ambos casos, existían 61 parámetros diferentes, cuyos valores fueron asignados desde la bibliografía y por cálculos previos.

Los resultados, detallados en el artículo, muestran que con este modelo es posible predecir adecuadamente la purificación de los anticuerpos monoclonales, y ofrece soluciones previas a la experimentación para mejorar la calidad de algunos compuestos. Como ejemplo, utilizando la simulación clásica, cuatro de las catorce proteínas estudiadas no cumplían los límites de impurezas marcados por la FDA; pero gracias al modelo, es posible encontrar modificaciones en corrientes, gradientes, orden de columnas, etc. que permiten satisfacer dichos requerimientos. Esto reduce mucho el tiempo y coste empleado en el desarrollo del proceso, facilitando la salida de estos productos al mercado.

A continuación, se presenta el artículo pendiente de publicación, donde se presenta todo el trabajo realizado durante la estancia, y que contiene los resultados más significativos de lo presentado en esta introducción.



# **Mathematical modelling of fluid flow and mass transfer in a three-column downstream process for monoclonal antibodies purification**

António L. Grilo<sup>a, §</sup>, Álvaro Gonzalez-Garcinuño<sup>b, §</sup>, Eva Martin del Valle<sup>b, c</sup>, Athanasios Mantalaris<sup>a, d, \*</sup>

a. Biological Systems Engineering Laboratory, Centre for Process Systems Engineering, Department of Chemical Engineering, Imperial College London. Exhibition Road, London SW7 2AZ. United Kingdom

b. Department of Chemical Engineering, University of Salamanca. Plaza de la Merced, 37008 Salamanca, Spain.

c. Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL). Paseo de San Vicente 58, 37007, Salamanca, Spain

d. Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering, Biomedical Systems Engineering Laboratory, Georgia Institute of Technology, 950 Atlantic Drive, Atlanta, GA 30332, USA

<sup>§</sup>Authors contributed equally to this work

\*Corresponding author: [sakis.mantalaris@gatech.edu](mailto:sakis.mantalaris@gatech.edu); ORCID: <https://orcid.or/0000-0001-6183-0292>

## **Abstract**

Monoclonal antibodies (mAbs) are transformative, high-specificity, high-value drugs produced from mammalian cell cultures and purified to clinical-grade standards imposed by regulatory agencies such as the Food & Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). The majority of costs associated with mAb production are related to downstream processing; reducing cost and time-to-market strategies provides a commercial edge. Herein, a mathematical model of a three-column strategy for mAb purification has been developed and utilized to describe both small- and large-scale operations. The model considers fluid flow and mass transfer in affinity, ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography columns to predict the separation of mAb from seven impurities. The model was employed to predict the purification of 14 mAbs covering 25 commercial designations equivalent to 70% of the market. In 4 cases, FDA requirements were not met necessitating implementation of targeted, model-guided modifications based on process understanding to achieve compliant operating conditions.

## **Keywords**

Monoclonal antibody, chromatography, modelling, fluid flow, mass transfer, three-column process, industrial-scale chromatography

## **Highlights**

- Mathematical model of a three-column downstream process for mAb purification was developed
- Mass-transfer and fluid flow were considered
- Small and large-scale operations were modelled
- Simulations were performed for 14 mAbs representing 70% of the market
- Process optimization was achieved using the model



## 1. Introduction

The therapeutic mAb market has grown 63% over the past 5 years nearing \$100b in 2017 in the United States and Europe [1]. Most blockbuster mAbs are approaching patent expiry in 2020, including Humira and Rituxan (expired in 2016), Remicade (expired in 2018) and Avastin and Herceptin (expires in 2019). In addition, faster regulatory approval processes, the emergence of biosimilars and the rise of emerging economies are increasing competition [1] and necessitating process optimization to render branded and biosimilar drugs competitive. While optimization has traditionally been experimentally-driven, model-based approaches have gained an increasingly important role in reducing process development/optimization costs [2]. Downstream processing (DSP), which includes harvesting of cells (usually by centrifugation, filtration or a combination of both), protein purification by chromatography, viral inactivation and removal and finally formulation [3], accounts for a significant share of bioprocessing costs. The most conservative estimates indicate a 50% split between upstream and downstream costs but other studies have suggested that DSP accounts for 80% of the total costs [4,5].

Owing to its high resolution and selectivity, chromatography is obligatory in the downstream processing of therapeutic biologics [3]. For mAbs, the first purification step is usually protein-A affinity chromatography, an expensive operation that accounts for 50% of the whole DSP costs [6]. The subsequent steps aim at removing impurities, such as host cell proteins (HCP), DNA, mAb aggregates (dimers and higher-order aggregates), and leached protein-A from affinity chromatography. Ion-exchange chromatography (IEX) and hydrophobic interaction chromatography (HIC) are among the most used chromatographic methods employed to achieve these goals, whereby the presence and concentrations of impurities determine the optimal sequence of unit operations and process conditions as listed in Table 1.

**Table 1:** Main uses of cation exchange (CEX), anion exchange (AEX) and hydrophobic interaction (HIC) chromatography in mAbs DSP.

	Main impurities removed
<b>CEX</b>	HCP, leached protein-A, aggregates
<b>AEX</b>	DNA, HCP, endotoxin
<b>HIC</b>	Aggregates, HCP, DNA, leached protein-A.

Modelling chromatographic operations is essential in reducing experimental screening of buffers, resins, running conditions etc., thereby significantly contributing to cost and time-to-market improvements. Currently, most chromatographic models developed have focused either on the kinetics of mass transfer processes neglecting fluid flow [7–9], or in modelling fluid flow only [10,11]. Analyzing fluid flow is essential when studying/performing chromatography scale-up and column packing operations. Lack of fluid flow description restricts model applicability to only lab-scale columns where fluid flow is not a limitation; in contrast, industrial-scale columns suffer from fluid flow inhomogeneities. In addition, existing models focus exclusively on target proteins only (usually mAbs) excluding impurities, which

renders them unable to predict yield or purity of the final product. Finally, most models usually consider a single column, whereas in industrial practice several chromatographic operations are performed in series.

Herein, an integrated mathematical model describing fluid flow and mass transfer kinetics in three different chromatographic unit operations working in series is reported. Filtration and viral inactivation/removal operations are not modelled but their effects, namely in mAb aggregation and concentration, are considered. The model was used to simulate both small and large scales and was applied to 14 commercially available mAbs demonstrating that performance of a “platform” strategy is dependent on the properties of the protein of interest and the process parameters used. The mAbs employed as case studies were selected based on their market share (70% of the market in 2017), their IgG subclass, and the availability of data. Where required, the model was used to predict the impact of process understanding-based modifications in order to achieve an FDA-compliant purification strategy. In conclusion, the model provides a novel tool that is useful in the application of quality-by-design (QbD) and screening of design spaces in downstream processing.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Model formulation**

#### **2.1.1. Flow modelling**

Irrespective of scale, the axial variation of pressure drop was computed from Ergun’s equation [13] (equation 1), where  $L$  is the bed height,  $\mu$  is the fluid viscosity,  $\varepsilon_c$  is the bed porosity,  $d_p$  is the diameter of the resin particles and  $u$  is the superficial velocity.

$$\frac{\partial P}{\partial z} = -L \frac{150\mu u(1-\varepsilon_c)^2}{d_p^2 \varepsilon_c^3} \quad (1)$$

Since chromatography columns are operating under laminar flow, turbulent flow was considered negligible at both small and large scales. The effective flow velocity can be computed using Bernoulli’s equation (equation 2), which relates the fluid velocity inside the column to the axial pressure drop.

$$P(z) = \frac{\rho}{2} v(z)^2 \quad (2)$$

However, in small-scale columns, mass transfer is not controlled by the velocity computed from Bernoulli’s equation since friction at the column wall results in velocity reduction affecting the overall performance of the column. Instead, the real velocity ( $v_r$ ) was

computed using Hazen-William's equation (equation 3) in order to increase the accuracy of velocity predictions.

$$v_r(z) = 0.2787\pi c \frac{d_c^2}{4} d_c^{2.63} S(z)^{0.54} \quad (3)$$

In equation 3,  $S(z)$  is known as the slope of the energy line, defined as the ratio of head loss over column length. In laminar flow, the friction factor ( $f$ ) and the Reynolds number ( $Re$ ) are related by  $f=64/Re$ . From the mathematical definition of head loss, assuming laminar flow,  $S(z)$  is given by

$$S(z) = \frac{64}{Re} \frac{v(z)^2}{2g d_c \varepsilon_c^2} \quad (4)$$

Chromatography columns are generally scaled-up by increasing diameter [15] rather than height. Consequently, the overall performance of large-diameter columns is less affected by the wall effect and the pressure drop can be computed using the Brinkman-Forchheimer equation only (equation 5) instead of the combined Hazen-Williams and Bernoulli's equations [16,17].

$$\frac{\partial P}{\partial z} = \mu \frac{v_r(z)}{k} \quad (5)$$

In equation 5,  $k$  is the permeability of the packed bed and  $v_r$  is the real velocity of the fluid. The permeability of the bed can be related to its porosity using the Carman-Kozeny correlation for laminar flow (equation 6) [18], where  $\varepsilon_c$  is the column porosity,  $d_p$  is the resin particle diameter and  $k_0$  is the Carman-Kozeny constant.

$$k = \frac{\varepsilon_c^3 d_p^2}{36k_0(1-\varepsilon_c)^2} \quad (6)$$

### 2.1.2. Mass transfer

The model considers the target protein (mAb) and 7 different types of impurities. For all species, the equations describing mass transfer are the same for both the mobile (equation 7) and the stationary (equation 8) phases.

$$\frac{\partial C_i(z)}{\partial t} = -v_r(z) \frac{\partial C_i(z)}{\partial z} + D a x_i(z) \frac{\partial^2 C_i(z)}{\partial z^2} - \frac{(1-\varepsilon_c)(1-\varepsilon_p)}{\varepsilon_c + \varepsilon_p(1-\varepsilon_c)} \frac{\partial Q_i(z)}{\partial t} \quad (7)$$

$$\frac{\partial Q_i(z)}{\partial t} = \frac{F_{in}C_{i0}(z) - F_{out}C_i(z)}{V(1-\varepsilon_c)} \quad (8)$$

The right-hand side (RHS) of equation 7 describes how the concentration of component  $i$  varies over time due to fluid flow (first term), axial dispersion (second term), and adsorption-retention-desorption kinetics (third term), which is altered according to the phenomena governing each chromatography operation [7]. Equation 8 is a global mass balance on the stationary phase (hence, the porosity correction in the RHS term denominator), where  $F_{in}$  and  $F_{out}$  are the inlet and outlet flow rates, respectively, and  $C_{i0}$  and  $C_i$  are the inlet and outlet concentrations of component  $i$ , respectively.

In the second term on the RHS of equation 7,  $Dax_i$  is the axial dispersion coefficient of component  $i$ , calculated from equation 9 as a function of the axial coordinate ( $z$ ), where  $Pe_i$  is the Peclet number for component  $i$  (equation 10) that depends on both the Reynolds (equation 11) and Schmidt (equation 12) numbers. In equation 12,  $Dm_i$  is the molecular diffusion coefficient of component  $i$ .

$$Dax_i(z) = \frac{v_r(z)L}{Pe_i} \quad (9)$$

$$Pe_i = ReSc_i \quad (10)$$

$$Re = \frac{\rho F d_c}{\mu A} \quad (11)$$

$$Sc_i = \frac{\mu}{\rho Dm_i} \quad (12)$$

150

#### 151 **2.1.2.1. Adsorption kinetics in protein-A affinity chromatography**

152 Modelling the protein-A affinity chromatography column assumes a macro-porous  
153 cross-linked agarose resin [19]. Affinity chromatography operation includes three stages,  
154 loading or adsorption, washing and elution. During loading, the process stream containing the  
155 target protein is assumed to enter the column at a velocity of 300 cm/h and a dynamic binding  
156 capacity of 45 g/L-resin. Since the model considers macro-porous particles, adsorption kinetics  
157 is controlled by mass transfer through a boundary layer around the particles. Consequently, the  
158 adsorption term in equation 7, for this particular unit operation, is calculated from equation 13,  
159 which states that adsorption is controlled by the transport of component  $i$  into the pores [17].

$$\frac{\partial Q_i(z)}{\partial t} = \frac{6}{d_p} Kf_i [C_i(z) - C_{ip}(z)] \quad (13)$$

The concentration of species  $i$  adsorbed to the column is a function of the axial position ( $z$ ), the mass transfer coefficient ( $Kf_i$ ), and the bulk and pore concentrations of species  $i$  in the mobile phase ( $C_i$  and  $C_{ip}$ , respectively). This mass transfer coefficient is defined by an empirical correlation from the penetration model (equation 14) [20].

$$Kf_i = \sqrt{\frac{4Dm_i}{\pi d_p}} \quad (14)$$

Protein concentration inside the pores (for all stages) is calculated from equation 15 (analogous to equation 7), where the kinetics of adsorption follows Langmuir extended kinetics defined by one coefficient for adsorption ( $Ka_i$ ) and one for desorption ( $Kd_i$ ) [21].

$$\frac{\partial C_{ip}(z)}{\partial t} = -v_r(z) \frac{\partial C_{ip}(z)}{\partial z} + Def f_i(z) \frac{\partial^2 C_{ip}(z)}{\partial z^2} - \frac{(1-\varepsilon_c)(1-\varepsilon_p)}{\varepsilon_c + \varepsilon_p(1-\varepsilon_c)} (Ka_i(Qmax_i - Q_i(z))C_{ip}(z) - Kd_i Q_i(z)) \quad (15)$$

The axial dispersion coefficient ( $Dax_i$ ) has been substituted in equation 15 by the effective dispersion coefficient ( $Def f_i$ ) in order to account for dispersion inside the porous particles. This value can be calculated using the Mackie and Meares correlation shown in equation 16 [22].

$$Def f_i = Dm_i \left( \frac{\varepsilon_p}{2-\varepsilon_p} \right)^2 \quad (16)$$

Elution of mAbs from protein-A resins is achieved by reducing pH from around 7 (used for loading and washing) to pH 2-3. As pH changes, at a rate numerically equal to the flow rate, the interaction between the mAb and the protein-A ligand weakens and the adsorption and desorption coefficients will vary directly and inversely, respectively, with pH [24] with an equilibrium constant described by the empirical correlation in equation 17 [25].

$$K(pH) = \frac{Ka}{Kd} = 5.6pH^3 - 41.2pH^2 + 101pH - 80.4 \quad (17)$$

#### 2.1.2.2. Adsorption kinetics in ion exchange chromatography

As described above, ion exchange is a relevant chromatographic step in DSP that removes several different types of impurities (Table 1). The IEX step is a CEX operation using a low substituted phenyl sepharose resin [30] and taking advantage of simultaneous pH and salt (sodium chloride, NaCl) positive gradients as a novel way to perform elution and improve

separation. The steric mass action (SMA) model was employed to describe CEX kinetics. For any component  $i$ , the SMA model can be summarized as follows [26]:

$$C_i + \frac{B_i}{n} Q_s \leftrightarrow \frac{B_i}{n} C_s + Q_i \quad (18)$$

where,  $B_i$  is the charge of component  $i$ , and  $C_s$  and  $Q_s$  are the salt concentrations in the mobile and stationary phases, respectively. The sum of the concentrations of all species interacting with the ion exchange column at a given position ( $z$ ) must be equal to the resin ligand density ( $Q_{\max}$ ); consequently,  $Q_{\max}$  is the maximum capacity of the column whereby

$$Q_{\max}(z) = Q_s(z) + \sum_i^{n \text{ comp}} Q_i(z) \quad (19)$$

The equilibrium constant of the reaction described in equation 18, for each component, can be written as

$$Ke_i = \frac{Q_i}{C_i} \left( \frac{C_s}{Q_s} \right)^{\frac{B_i}{n}} \quad (20)$$

This equilibrium constant can be estimated as a function of temperature ( $T$ ) and the Gibbs free-energy of ion exchange ( $\Delta G_i^0$ ) from equation 21 [27].

$$\ln(Ke_i) = \frac{B_i}{n} \frac{\Delta G_s^0}{RT} - \frac{\Delta G_i^0}{RT} \quad (21)$$

$B_i$  is calculated from equation 22 as a function of the number of basic amino acid residues (lysine, histidine and arginine), denoted  $N_j$ , and the number of acidic amino acid residues (aspartate and glutamate), denoted  $N_k$  [27].

$$B_{p,i} = \sum_j \frac{N_j}{1+10^{pH-pK_{a(j)}}} - \sum_k \frac{N_k}{1+10^{pK_{a(k)}-pH}} \quad (22)$$

The Davis equation (equation 23) corrects the  $pK_a$  values for acidic amino acid residues in the absence of salt to the corresponding values in the presence of salt ( $pK_{a(j,k)}$ ), where  $C_s$  is the salt concentration and  $A_{\text{Debye}}$  takes the value of 0.5114 for water at 20°C [27].

$$pK_{a(j,k)} = pK_a + 2 \left( \frac{A_{\text{Debye}} \sqrt{C_s}}{1 + \sqrt{C_s}} - 0.1 C_s \right) \quad (23)$$

As mentioned above, salt and pH gradients were applied to the column operating in bind-and-elute mode. The profiles of salt and pH are described by equations 24 and 25, respectively [27], where  $C_{s0}$  and  $pH_0$  are, respectively, the salt concentration and pH of the

mobile phase at the column inlet. GHs and GHpH are the normalized salt and pH gradients, respectively, as defined elsewhere [27].

$$\frac{\partial Cs_0}{\partial t} = \frac{F_{in}GH_s}{V(1-\varepsilon_c)} \quad (24)$$

$$\frac{\partial pH_0}{\partial t} = \frac{F_{in}GH_{pH}}{V(1-\varepsilon_c)} \quad (25)$$

Ion exchange kinetics follows equation 7, where adsorption is controlled by mass transfer (equation 27) driven by the difference between the concentration of component  $i$  in the stationary phase ( $Q_i$ ) and its equilibrium concentration ( $Q_i^*$ ).

$$\frac{\partial Q_i(z)}{\partial t} = \frac{6}{d_p} Kf_i [Q_i^*(z) - Q_i(z)] \quad (26)$$

As before, the mass transfer coefficient is calculated from equation 14 and the concentration at equilibrium ( $Q_i^*$ ) is calculated as a function of the equilibrium constant ( $Ke_i$ ) from equation 27 [28].

$$Q_i^*(z) = C_i(z)Ke_i \left( \frac{Q_s(z)}{C_s(z)} \right)^{\frac{B_i}{n}} \quad (27)$$

### 2.1.2.3. Adsorption kinetics in hydrophobic interaction chromatography

HIC separates molecules based on hydrophobicity. The hydrophobicity of a protein can be modified by the ionic strength around it. It is common practice to apply a negative salt gradient (calculated from equation 24) to perform elution [29]. The kinetics of retention in HIC follows equation 26, where the equilibrium concentration is replaced by the maximum concentration of component  $i$  in the stationary phase ( $Q_i^{max}$ ) calculated from equation 28 [30], where  $\omega_i$  is the characteristic number of binding sites of component  $i$  estimated using Emini's method of surface probability prediction [31] (Supplementary material A).  $Q_{max}$  (resin ligand density) and  $\sigma$  (steric factor) are parameters of the resin (Table 2),  $\alpha$  is a salt-dependent parameter (Table 2), and the solvation energy for each species was estimated as a function of the surface area [32].

$$Q_i^{max}(z) = \left( Q_{max} - Q_i(\sigma + \omega_i) \right)^{\omega_i} K_{S,i} C_i(z) C_s^\alpha \quad (28)$$

237 The equilibrium constant,  $K_{s,i}$ , is calculated from the Gibbs free energy of solvation ( $\Delta G_i$ ) using  
 238 equation 29.

$$239 \quad K_{s,i} = Ke^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \quad (29)$$

240 The salt considered for HIC simulations was sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) since it presents the  
 241 highest  $\alpha$  (2.59) [30] and its mobile phase concentration is calculated from equation 7. The  
 242 initial salt concentration was assumed to be 4.1 M [33].

243

244 **Table 2:** Process parameters for affinity, CEX and HIC chromatographies considered in model  
 245 simulations.

Parameter		Units	Value		Reference	
			Small Scale	Large Scale	Small Scale	Large Scale
Feeding Concentrations	mAb	mol/L (g/L)	1.0x10 <sup>-5</sup> (1.4)		[6]	
	DNA	mol/L	8.0x10 <sup>-10</sup>		[44]	
	HCPa	mol/L	9.0 x10 <sup>-7</sup>		[40]	
	HCPb	mol/L	9.0x10 <sup>-7</sup>			
	HCPc	mol/L	5.4x10 <sup>-7</sup>			
	Aggregate	mol/L	5.5x10 <sup>-8</sup>		[45]	
Dimer	mol/L	8.3x10 <sup>-8</sup>				
Fluid properties	ρ	kg/m³	1000		Values for water	
	μ	Pa.s	0.001			
Molecular diffusion coefficients (D <sub>mi</sub> )	mAb	m²/s	4.0x10 <sup>-11</sup>		[46]	
	DNA	m²/s	4.2x10 <sup>-11</sup>		[47]	
	HCPa	m²/s	2.7x10 <sup>-11</sup>		Calculated using Stokes-Einstein equation (dependent on radius)	
	HCPb	m²/s	6.2x10 <sup>-11</sup>			
	HCPc	m²/s	1.5x10 <sup>-11</sup>			
	Aggregate	m²/s	8.0x10 <sup>-12</sup>		[48]	
	Dimer	m²/s	5.9x10 <sup>-13</sup>			
Affinity	d <sub>c</sub>	m	0.015	1.0	[49]	[15]
	L	m	0.060	0.20	[50]	
	ε <sub>c</sub>	-	0.4		[27]	
	ε <sub>p</sub>	-	0.55		[51]	
	u	m/s	2.85x10 <sup>-3</sup>	5x10 <sup>-4</sup>	[50]	[52]
	d <sub>p</sub>	μm	40		[53]	
	P <sub>in</sub>	bar	50	30	[50]	
	K <sub>a</sub>	(M.s) <sup>-1</sup>	419		[43]	
	K <sub>d</sub>	s <sup>-1</sup>	7x10 <sup>-3</sup>			
	Q <sub>max</sub> mAb	mol/L-resin	4.2x10 <sup>-4</sup>		[19]	
	Q <sub>max</sub> DNA	mol/L-resin	8.4x10 <sup>-6</sup>		[54]	
	Q <sub>max</sub> HCPa	mol/L-resin	2.1x10 <sup>-5</sup>		Estimated as 5% of Q <sub>max</sub> of mAbs	
	Q <sub>max</sub> HCPb	mol/L-resin				
	Q <sub>max</sub> HCPc	mol/L-resin				
	Q <sub>max</sub> Ag	mol/L-resin	4.2x10 <sup>-4</sup>		Considering mAbs and aggregates interact equally with the column	
Q <sub>max</sub> Dimer	mol/L-resin					
CEX	d <sub>c</sub>	m	0.02	1	[49]	[55]
	L	m	0.18	0.4		
	ε <sub>c</sub>	-	0.4		[27]	
	ε <sub>p</sub>	-	0.55		[51]	
	u	m/s	0.00185	0.0005	[49]	[52]
	d <sub>p</sub>	μm	40		[56]	



	P <sub>in</sub>	bar	60	30	[57]	
	GHs	M	0.002		[56]	
	GHpH	-	0.03		[27]	
	pKaLys	-	10.79		[58]	
	pKaHis	-	6.04		[58]	
	pKaArg	-	12.48		[58]	
	pKaGlu	-	4.25		[58]	
	pKaAsp	-	3.86		[58]	
	n	-	1		Na <sup>+</sup> charge	
	Q <sub>max</sub>	mol/L-resin	0.001		[56]	
	ΔG Agg	J/mol	73127		[27]	
	ΔG Dimer	J/mol	65549		[27]	
	ΔG mAb	J/mol	44624		[27]	
	ΔG salt	J/mol	4754		[27]	
	ΔG HCPa	J/mol	25000		Approximation based on MW range [59]	
	ΔG HCPb	J/mol	25000			
	ΔG HCPc	J/mol	25000			
	ΔG P-A	J/mol	25000			
	pH (t=0)	-	5.5		[24]	
	C <sub>s</sub> (t=0)	mM	40		[24]	
	A	-	0.511		[27]	
	B	-	0.1		[27]	
	T	K	298		-	
	pH(t=0)	-	5.5		[60]	
HIC	d <sub>c</sub>	m	0.025	1	[61][62]	[15]
	L	m	0.25	0.2		
	ε <sub>c</sub>	-	0.4		[27]	
	ε <sub>p</sub>	-	0.55		[51]	
	V <sub>s</sub>	m/s	0.00185	0.0007	[62]	[52]
	d <sub>p</sub>	μm	10	60	[63]	[64]
	P <sub>in</sub>	bar	50	30	[57]	
	GHs	M	0.050		[64]	
	ΔG <sub>p</sub>	kcal/mol	1.1		[65]	
	ΔG HCPa	kcal/mol	0.65		Estimated from [32]	
	ΔG HCPb	kcal/mol	0.65			
	ΔG HCPc	kcal/mol	0.35			
	ΔG Ag	kcal/mol	0.45			
	ΔG Dim	kcal/mol	0.45			
	C <sub>s</sub> (t=0)	M	4.1		[33]	
	Q <sub>max</sub>	mol/L-resin	9.0x10 <sup>-4</sup>		[30]	
	α	-	2.59			
	σ	-	26			

246

### 247 2.1.3. Other process considerations

248 Although the model focuses on the detailed description of chromatographic operations,  
249 it is important to consider the impact of other process variables and steps. Firstly, viral  
250 inactivation is assumed to be achieved by a 2-hour hold at pH 3.03, which can cause a 20%  
251 aggregation of the monomer in the protein-A pool [34]. Secondly, a concentration step has  
252 been considered before IEX, according to common industrial practice [5]. This is assumed to  
253 allow for buffer exchange and a volumetric concentration of 4x. Finally, leaching of protein-  
254 A ligands into the process stream has been accounted as another impurity to be removed. The  
255 total amount of leached protein A is estimated at 110 ng.prot-A/ng.mAb [35]. The model is  
256 flexible in selecting the times for each stage (loading, washing and elution) in each

chromatography step and the loading composition and conditions (mAb titer, impurities, flow rates etc.).

#### **2.1.4. Discretization method and boundary conditions**

To numerically solve the partial differential equations on the axial domain of the column, the column axis must be discretized. Four different strategies were compared (Supplementary Material B) and the selection was based on convergence and time of execution. The chosen strategy includes calculations every 10mm for the affinity column and every millimeter for both the IEX and HIC columns. Boundary conditions were provided for each column, following those presented by Robin (for mass balance) [36] and Neumann (for fluid flow modelling) [37], as considered in previous publications [7].

#### **2.1.5. Yield and purity calculations**

In order to integrate the three columns, it is essential to compute the concentration of all the components in the mAb-rich fraction collected from the previous column and fed to the next, which is calculated by the area under the curve (peak) between 1% and 99% mAb recovery from equations 30 and 31. The concentration of each component in the stream fed to the next column can be estimated from equation 32, where the volume of each collected fraction is calculated by the product of the flow rate times the collection time.

$$\frac{\partial P_i}{\partial t} = C_i(L) \quad (30)$$

$$M_i = P_i F_{in} \quad (31)$$

$$C_{fraction}^i = \frac{M_i}{V_{fraction}} \quad (32)$$

The overall yield was the ratio of the mass of mAb at the end of the third chromatography column over the initial mass of mAb loaded into the first column. Final purity is the ratio of the mass of mAb collected over the sum of the masses of all the components (mAbs and impurities) collected in the mAb-rich fraction (equation 33).

$$Purity(\%) = 100 \frac{M_{mAb}}{\sum_i M_i} \quad (33)$$

#### **2.1.6. Dynamic binding capacity (DBC)**

The dynamic binding capacity (DBC) is defined as the maximum amount of target protein that binds to the resin under dynamic conditions (i.e., with fluid flow) and is calculated from equation 34 [38].

$$DBC = C_{mAb,0} V_{resin} V_l \quad (34)$$

where,  $C_{mAb,0}$  is the amount of mAb fed into the column,  $V_{resin}$  is the volume of the resin ( $m^3$ ), and  $V_l$  is the volume of material supplied to the column per column volume, defined by

$$V_l = \frac{uAt}{V_{column}} \quad (35)$$

where,  $u$  is the superficial velocity ( $ms^{-1}$ ),  $V_{column}$  is the volume of the column ( $m^3$ ), and  $t$  is the time of loading (s).

#### **2.1.7. Process assumptions**

Several simplifying assumptions to the model, while maintaining the relevance of its predictions, were made:

- a. The distribution of ligands was considered homogeneous throughout the column and in each particle. The distribution of particles was also considered homogeneous along and across the column with no preferential channels for fluid flow existing.
- b. Radial dispersion was been considered because of its small influence in these type of processes [39];
- c. Leaching of IEX and HIC ligands during operation was negligible;
- d. No volume accumulation was considered; the flow rate at the inlet being the same as at the outlet;
- e. Only three types of Host Cell Proteins (HCPs) were considered as impurities as they represent about 75% of the total HCPs present in harvested cell culture fluid (HCCF), namely the elongation factor (HCPa), clusterin (HCPb) and cytoplasmic actin (HCPc) [40].
- f. Three other impurities were considered, specifically DNA, mAb dimers and high-order mAb aggregates. Higher-order aggregates were simplified as trimmers for property calculation purposes;
- g. The hydrophobicity factor was considered to be the same for monomers and aggregates. The affinity adsorption and desorption coefficients for aggregates were considered the same as for monomers, since mAb/protein affinity interaction was based on a Fc-region interaction with protein-A ligands.

- h. Only one chromatography cycle was simulated per column.
- i. Glycosylation was not considered since it is not significant in the downstream processing of mAbs [41].

## **2.2. Model implementation and structure**

The model was implemented and simulated in gPROMS 4.2.0 (PSE, UK) running on a 3.4 GHz personal computer with 16 GB ram memory. With the chosen axial discretization strategy, the model for small-scale chromatography columns has 25,133 equations (12,729 algebraic and 12,404 differential) requiring 62 seconds to run. The large-scale model has 37,406 equations (16,834 algebraic and 20,572 differential) requiring 924 seconds to run. Both models have 61 parameters, which are summarized in Table 2. Data were processed and presented using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA).

## **2.3. Case-studies**

The model predicts the behavior of different types of mAbs depending on their subclass (IgG1 or IgG2), amino acid composition, and hydrophobicity (surface residues). The model was used to assess the performance of the purification method for 14 different mAbs (25 commercial designations). Table 3 shows the selected mAbs and their relevant specific properties. For each mAb, their amino acid composition was obtained from DrugBank 4.0 [42] and their affinity coefficients from Biorad technical notes [43].

**Table 3:** Molecule-specific properties affecting each of the unit operations considered for the 14 mAbs considered in this work.

Molecule name	Type	Affinity		Ion exchange					HIC
		K <sub>a</sub>	K <sub>d</sub>	#Lys	#Arg	#His	#Asp	#Glu	ω
Rituximab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	49	16	13	23	31	2.90
Adalimumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	24	15	6	18	16	2.14
Infliximab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	28	6	9	13	17	5.52
Bevacizumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	45	16	14	32	26	2.81
Trastuzumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	45	20	13	29	30	3.03
Ranibizumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	26	10	18	18	16	2.29
Cetuximab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	44	17	13	26	31	6.86
Palivizumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	16	8	0	16	4	5.29
Pertuzumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	44	19	11	28	31	2.86
Omalizumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	43	18	15	31	31	3.25
Secukinumab	<i>IgG1</i>	88	0.0007	41	24	12	27	35	3.23
Eculizumab	<i>IgG2</i>	419	0.007	26	11	5	18	19	2.23
Panitumumab	<i>IgG2</i>	419	0.007	24	11	7	21	16	2.30
Denosumab	<i>IgG2</i>	419	0.007	43	23	9	26	33	2.82

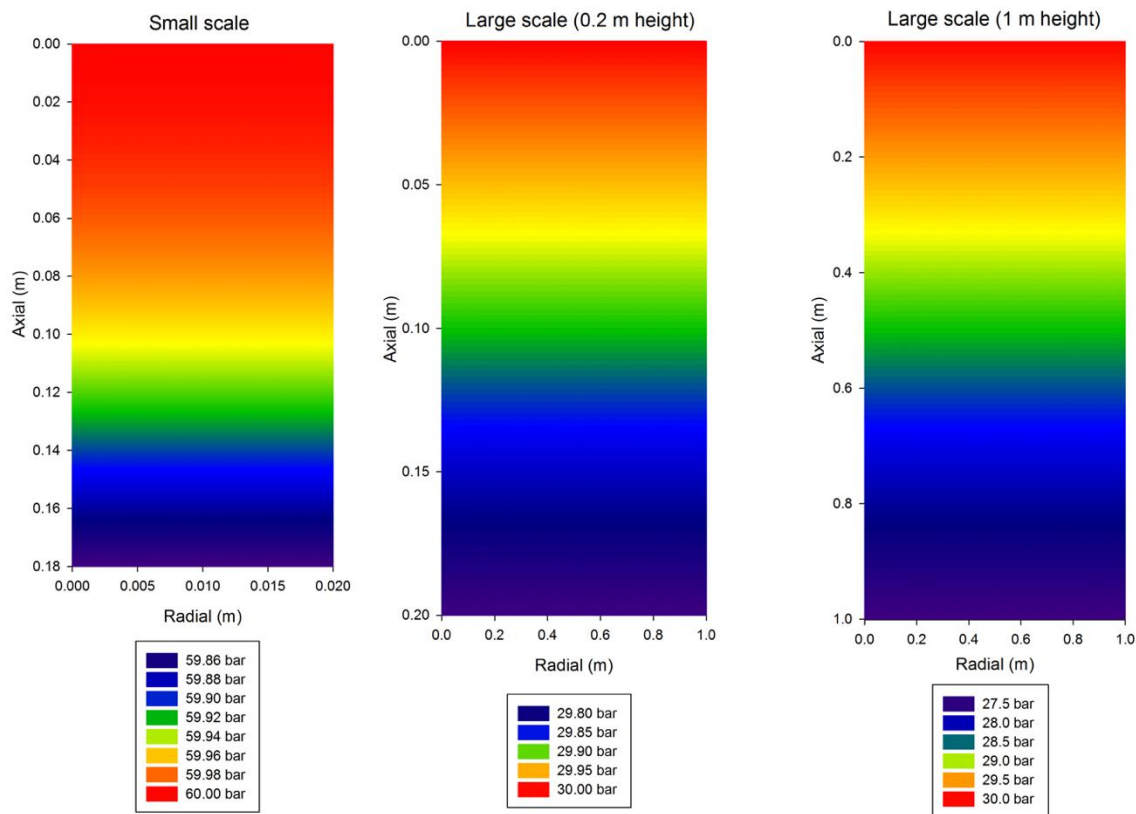
### 3. Results and Discussion

In the following sections, *Rituximab* (an IgG1 commercial therapeutic mAb) will be used as a base-case scenario. This molecule is currently being marketed as a branded biologic (Rituxan<sup>®</sup>) and two biosimilars (Rixathon<sup>®</sup> and Truxima<sup>®</sup>).

#### 3.1. Fluid flow modelling

Different simulations were conducted to obtain pressure profiles inside small and large-scale chromatography columns. Figure 1 represents the pressure profiles along a 2cm-wide, 18cm-tall column (small scale) and two 100cm-wide large-scale columns with bed heights of 20 cm and 1 m, respectively. From Figure 1 it can be concluded that variations in pressure drop with axial position are more significant at large scale than at small scale. In addition, it can be also observed that increasing the bed height leads to increasingly significant pressure drops (0.2 bar for 20 cm bed height versus 2.5 bar for 1 m bed height). This suggests that the model can be used to estimate the maximum bed height to avoid exceeding the

maximum allowable pressure drop. Pressure drop results for small-scale and large-scale 0.2m bed height columns were in accordance with experimental data previously reported in literature whereby pressure drops between 0.1 to 0.4 bar were observed [66]. Pressure drop increases with bed height justifying common scale-up practice of increasing columns radially rather than axially. Being able to model the flow inside the column allows to define other significant parameters more accurately, such as dynamic binding capacities (DBC) that are highly dependent on linear velocity [19], as described by equations 34 and 35.

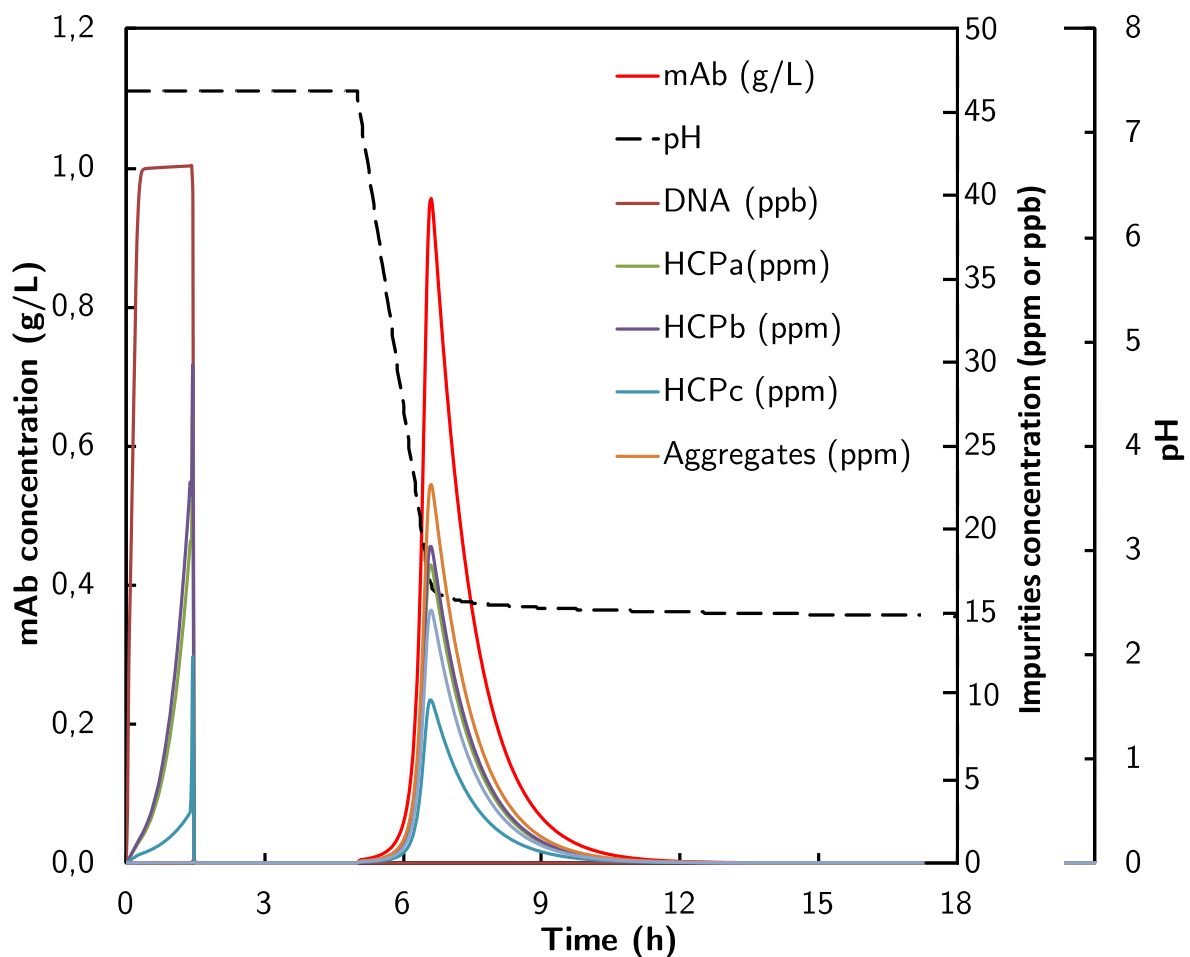


**Figure 1:** Predicted pressure profiles inside small and large-scale chromatography columns.

### 3.2. Affinity chromatography

As presented in Table 1, the affinity chromatography model was run at large scale (column diameter 1 m and column length 0.20 m) with a loading time of 80 minutes, which allows for a DBC of 45 g mAb.L-resin<sup>-1</sup>. This is in agreement with previously published results reporting an experimental range of 15 to 50 g mAb.L-resin<sup>-1</sup> at industrial scale [52]. Washing time was determined by analysis of the flow through from the column. When no impurities can be seen in the chromatogram, elution can start. Times for the different operation stages (loading, washing and elution) were scaled-up using a constant time/volume ratio, whereby

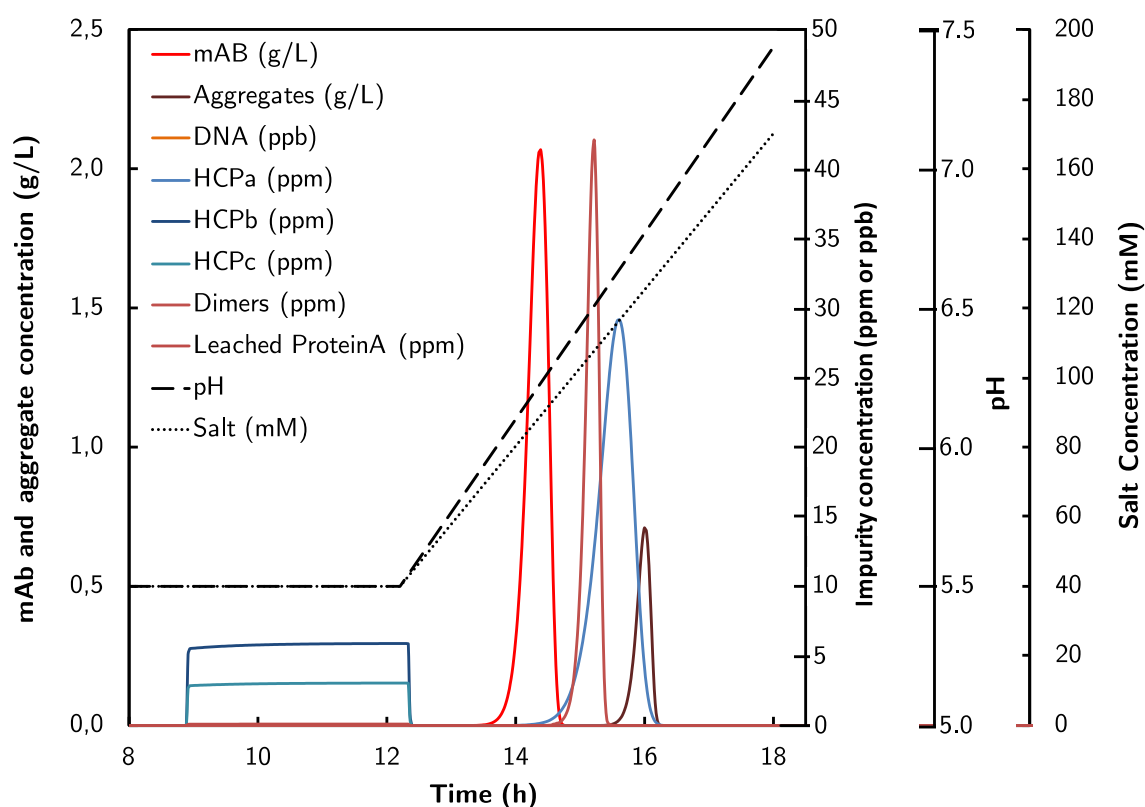
times where increased in the same proportion as the column volume because the velocities were similar [67]. Figure 2 depicts the mobile phase mAb and impurity concentrations over time at the outlet of the large-scale affinity column. It was observed that some HCPs remain inside the column co-eluting with the mAb, a phenomenon that has also been noticed experimentally and shown to be caused by a weak interaction between HCPs and mAbs [68]. Most of the DNA is removed in this step, while dimers and aggregates co-elute with the monomer due to Fc-region/Protein-A interactions. Collection of eluates from the affinity column occurs between 1% and 99% of peak area. The collected fraction is pumped into a stirred tank and held at low pH (3.03) for virus inactivation for 2 hours leading to a 20% loss in monomer concentration due to aggregation [34].



**Figure 2:** Model prediction of the large-scale affinity chromatogram (at  $Z = L$ ) including mAb (red), DNA (brown), HCPa (green), HCPb (purple), HCPc (cyan), aggregates (orange) and dimers (blue) peaks and the pH gradient (black dashed line).

### 3.3. Ion exchange chromatography

The differences in charge of the remaining impurities allow for their clear separation from the monomeric mAb, especially aggregates and dimers. Figure 3 depicts model simulations for the cation exchange chromatogram in which 6 different peaks can be clearly distinguished. Given that this is a CEX operated in bind-and-elute mode, components with negative or zero charge elute in the flow-through as they do not interact with the resin. At the starting pH of 5.5, these include HCPb, HCPc, leached protein-A and DNA. The mAb is eluted next followed by dimers, aggregates, and finally HCPa. Some impurities remain in the collected mAb-rich fraction and would be removed in the next step (HIC) to satisfy purity requirements imposed by the FDA/EMA.

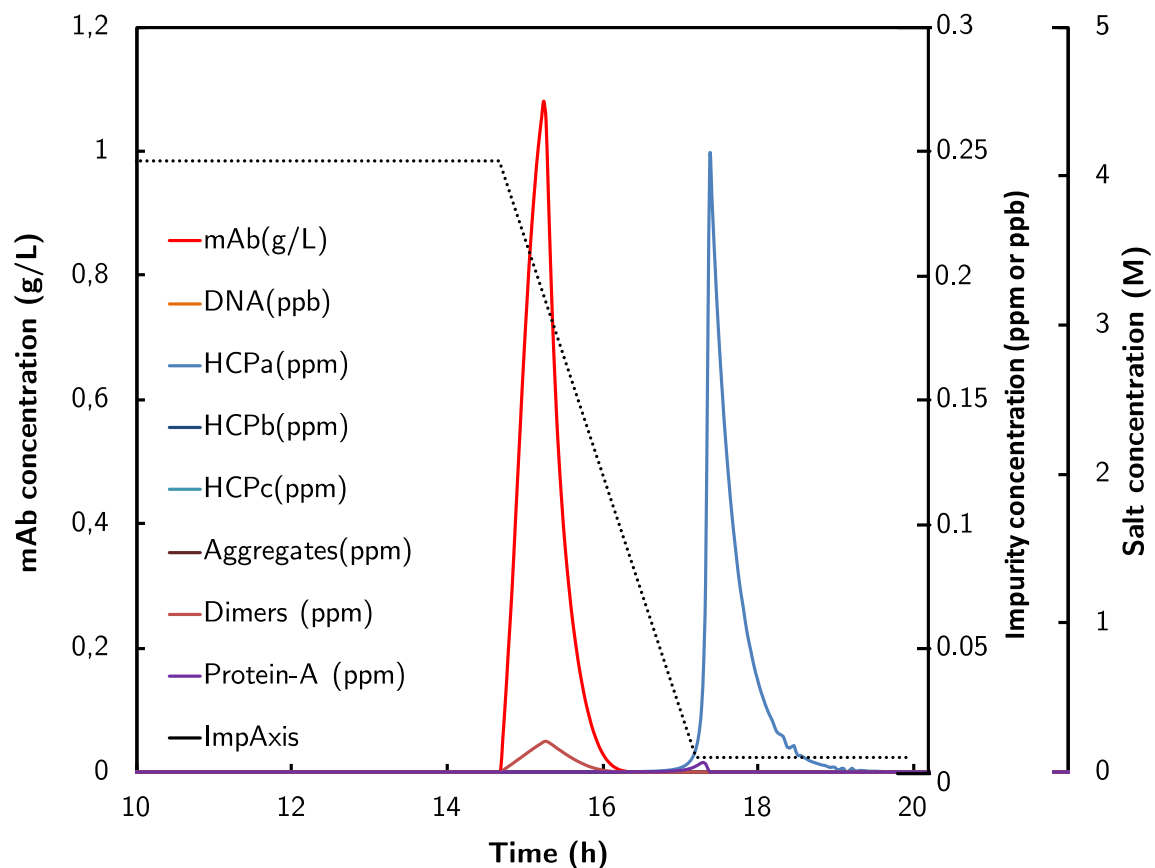


**Figure 3:** Model prediction of the large-scale cation exchange chromatogram (at  $Z = L$ ) including peaks for mAb (red), DNA (orange, not visible), HCPa (light blue), HCPb (dark blue), HCPc (cyan), aggregates (brown) and dimers (light brown) peaks and the gradients of pH gradient (black dashed line) and salt (black dotted line).



### 3.4. Hydrophobic interaction

At the last step of protein purification, impurities are separated from the product based on differences in their hydrophobicity. Figure 4 represents the chromatogram for the final removal of host cell proteins (mostly HCPa) in order to achieve regulatory compliance. As mentioned earlier, proteins were loaded at high ionic strength (4.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), which leads to salting out and exposure of hydrophobic regions prone to interact with the hydrophobic ligands of the column. A negative salt gradient was then applied in order to reduce the hydrophobicity of the proteins allowing for their separation and different elution times. It was observed that mAb elution started concomitant to the salt gradient s, while elution of host cell proteins did not occur until salt concentration reaches 0.5 M. These differences enable the separation of the remaining HCPs from the target mAb. When the salt concentration in the mobile phase reached 0.1 M, the gradient stopped and separation continued. For *Rituximab*, the yield achieved after the three-column process was 73% and the purity was 99.99%, which are in accordance to literature on the yield in the mAb DSP [69].



**Figure 4:** Model prediction of the large-scale hydrophobic interaction chromatogram (at Z = L) including peaks for mAb (red), DNA (orange, not visible), HCPa (light blue), HCPb (dark blue, not visible), HCPc (cyan, not visible), aggregates (brown, not visible) and dimers (light brown) peaks and the gradient of salt (black dotted line).

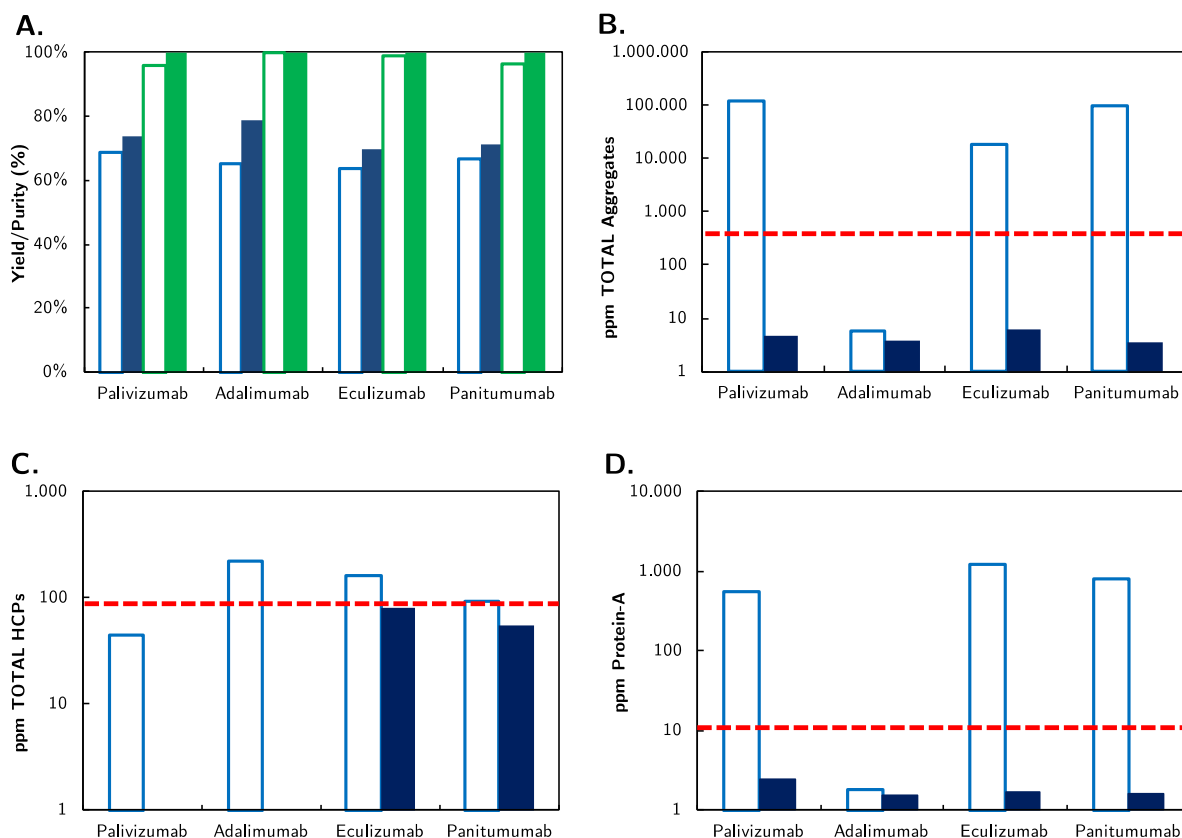
In order to demonstrate model flexibility and applicability as a process development tool, two possible process configurations, (1) Affinity, IEX, HIC and (2) Affinity, HIC, IEX, were assessed for the 14 top-selling mAbs. Process parameters were the same as the ones used in the Rituximab simulation (Table 2), while protein-specific values are provided in Table 3. The performance of configurations 1 and 2 for each molecule are summarized in Table 4, which shows the impurity contents of the final fraction for each mAb under each configuration, the final yields, the best configuration for each mAb, and those cases that do not satisfy regulatory criteria. The FDA requires that the maximum concentration of HCPs be 100 ppm, leached-protein A up to 10 ppm, aggregates (dimers or high order aggregates) up to 1000 ppm, and endogenous DNA up to 10 ppb [70]. Table 4 shows that for 9 of the 14 mAbs considered both configurations provided an FDA-compliant drug substance at comparable purity (*Rituximab*, *Bevacizumab*, *Trastuzumab*, *Ranibizumab*, *Cetuximab*, *Pertuzumab*, *Omalizumab*, *Secukinumab* and *Denosumab*) with the yields being generally higher for configuration 1, which also resulted in lower amounts of HCPs in the final product. For *Infliximab*, a compliant drug-substance can only be achieved using configuration 1 whereas opting for configuration 2 leads to a high concentration of Protein-A in the product stream. The cut-off times for collecting the mAb-rich fraction (chosen in order to maximize yield) compromised the performance of the second strategy. Finally, there were 4 mAbs for which neither of the suggested configurations achieved the regulatory requirements. *Palivizumab* failed to meet the aggregates limit, *Adalimumab* did not satisfy the HCPs content, and the HCPs concentrations for *Eculizumab* and *Panitumumab* were too high. In these cases, a detailed analysis of the process was conducted and process understanding was implemented to identify possible process changes which could improve process performance.

**Table 4:** Simulation results for 14 molecules under configurations 1 and 2. Impurity concentrations that do not meet FDA requirements are marked in red; the best configuration for each compliant molecule is marked in green.

Molecule	IgG Subclass	Affinity-IEX-HIC										Affinity-HIC-IEX									
		Ag. (ppm)	Dim. (ppm)	P-A (ppm)	DNA (ppb)	HCP (ppm)				Yield (%)	Purity (%)	Ag. (ppm)	Dim. (ppm)	P-A (ppm)	DNA (ppb)	HCP (ppm)				Yield (%)	Purity (%)
						A	B	C	Total							A	B	C	Total		
Rituximab	1	1.5x10 <sup>-4</sup>	6.7	1.0x10 <sup>-1</sup>	2.0x10 <sup>-7</sup>	6.0x10 <sup>-2</sup>	6.0x10 <sup>-14</sup>	1.0x10 <sup>-13</sup>	6.0x10 <sup>-2</sup>	73	99.99	4.0x10 <sup>-5</sup>	3.2	8.3x10 <sup>-1</sup>	5.5x10 <sup>-16</sup>	5.4x10 <sup>1</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	5.4x10 <sup>1</sup>	72	96.20
Adalimumab		1.1x10 <sup>-4</sup>	5.7	1.8	7.0x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-7</sup>	9.9x10 <sup>1</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>	2.2x10 <sup>2</sup>	65	99.93	4.3x10 <sup>-5</sup>	3.0	2.7x10 <sup>5</sup>	1.5x10 <sup>-8</sup>	1.6x10 <sup>-6</sup>	6.9x10 <sup>3</sup>	5.5x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	72	96.20
Infliximab		1.6x10 <sup>-4</sup>	7.5	3.6x10 <sup>-1</sup>	6.0x10 <sup>-6</sup>	1.3x10 <sup>-7</sup>	5.0	7.0	1.2x10 <sup>1</sup>	72	99.99	5.9x10 <sup>-5</sup>	3.7	1.8x10 <sup>5</sup>	2.3x10 <sup>-8</sup>	2.6x10 <sup>-5</sup>	6.0x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	72	96.90
Bevacizumab		9.0x10 <sup>-5</sup>	8.8	3.3x10 <sup>-1</sup>	1.7x10 <sup>-7</sup>	2.0x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-13</sup>	3.0x10 <sup>13</sup>	2.0x10 <sup>-5</sup>	73	99.99	3.2x10 <sup>-5</sup>	3.7	5.0x10 <sup>-3</sup>	4.8x10 <sup>-15</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	3.0x10 <sup>2</sup>	72	99.99
Trastuzumab		2.2x10 <sup>-4</sup>	7.7	6.0x10 <sup>-2</sup>	2.1x10 <sup>-7</sup>	1.2x10 <sup>-4</sup>	2.6x10 <sup>-14</sup>	4.8x10 <sup>-14</sup>	1.2x10 <sup>-4</sup>	74	99.99	5.0x10 <sup>-5</sup>	8.1	6.0x10 <sup>-4</sup>	6.0x10 <sup>-15</sup>	2.1x10 <sup>-1</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	2.3x10 <sup>3</sup>	72	99.99
Ranibizumab		1.0x10 <sup>-4</sup>	7.2	1.4	1.3x10 <sup>-7</sup>	5.0x10 <sup>-4</sup>	7.0x10 <sup>-13</sup>	1.3x10 <sup>-12</sup>	5.0x10 <sup>-4</sup>	75	99.99	2.6x10 <sup>-5</sup>	54.8	5.0x10 <sup>-3</sup>	3.3x10 <sup>-15</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	3.0x10 <sup>2</sup>	72	99.99
Cetuximab		1.9x10 <sup>-4</sup>	8.0	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.9x10 <sup>-7</sup>	1.6x10 <sup>-6</sup>	5.0x10 <sup>-15</sup>	9.5x10 <sup>-15</sup>	1.6x10 <sup>-6</sup>	73	99.99	1.6	5.1	5.4x10 <sup>-4</sup>	9.5x10 <sup>-15</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	73	99.99
Palivizumab		1.1x10 <sup>5</sup>	6.5x10 <sup>3</sup>	5.6x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	5.3x10 <sup>-11</sup>	2.0x10 <sup>1</sup>	2.5x10 <sup>1</sup>	4.4x10 <sup>1</sup>	69	95.97	1.1x10 <sup>5</sup>	4.0x10 <sup>-2</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>	9.7x10 <sup>-8</sup>	9.6x10 <sup>-9</sup>	8.8x10 <sup>3</sup>	6.6x10 <sup>3</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	72	92.10
Pertuzumab		1.9x10 <sup>-4</sup>	7.9	2.0x10 <sup>-1</sup>	1.8x10 <sup>-7</sup>	4.0x10 <sup>-6</sup>	8.0x10 <sup>-14</sup>	1.5x10 <sup>-13</sup>	4.0x10 <sup>-6</sup>	74	99.99	9.6x10 <sup>-5</sup>	3.7	6.0x10 <sup>-1</sup>	5.5x10 <sup>-11</sup>	2.0x10 <sup>-3</sup>	8.3	6.4	1.5x10 <sup>1</sup>	73	99.99
Omalizumab		5.0x10 <sup>-3</sup>	2.0x10 <sup>1</sup>	1.2	1.7x10 <sup>-7</sup>	4.9x10 <sup>-5</sup>	2.2x10 <sup>-6</sup>	1.5x10 <sup>-6</sup>	5.4x10 <sup>-5</sup>	75	99.99	2.3x10 <sup>-4</sup>	5.3	3.0x10 <sup>-1</sup>	6.5x10 <sup>-12</sup>	3.2x10 <sup>-5</sup>	1.0	6.0x10 <sup>-1</sup>	1.6	73	99.99
Secukinumab		2.8x10 <sup>-4</sup>	8.1	2.8	1.8x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	2.7x10 <sup>-12</sup>	5.0x10 <sup>-12</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	73	99.99	6.0x10 <sup>-2</sup>	5.6	6.0x10 <sup>-1</sup>	6.1x10 <sup>-15</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	9.3	6.6	1.6x10 <sup>1</sup>	73	99.99
Eculizumab	2	1.3x10 <sup>4</sup>	5.8x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	3.8x10 <sup>-7</sup>	9.5x10 <sup>-11</sup>	7.2x10 <sup>1</sup>	9.0x10 <sup>1</sup>	1.6x10 <sup>2</sup>	64	99.10	2.1x10 <sup>4</sup>	6.4x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>	1.4x10 <sup>-9</sup>	8.0x10 <sup>-9</sup>	9.5x10 <sup>3</sup>	7.8x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>4</sup>	73	93.90
Panitumumab		9.0x10 <sup>4</sup>	5.7x10 <sup>3</sup>	8.2x10 <sup>2</sup>	4.2x10 <sup>-7</sup>	5.4x10 <sup>-11</sup>	4.2x10 <sup>1</sup>	5.2x10 <sup>1</sup>	9.4x10 <sup>1</sup>	67	96.70	1.0x10 <sup>5</sup>	6.5x10 <sup>3</sup>	3.2x10 <sup>3</sup>	1.4x10 <sup>-9</sup>	7.5x10 <sup>-9</sup>	9.2x10 <sup>3</sup>	7.6x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>4</sup>	72	91.70
Denosumab		2.1x10 <sup>-4</sup>	3.9	1.7	1.9x10 <sup>-6</sup>	4.8x10 <sup>-4</sup>	4.0x10 <sup>-2</sup>	3.0x10 <sup>-2</sup>	7.0x10 <sup>-2</sup>	79	99.99	7.0x10 <sup>-5</sup>	3.7	2.0x10 <sup>-1</sup>	1.5x10 <sup>-10</sup>	3.9x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	2.0x10 <sup>-2</sup>	73	99.99

### 3.5. Model-guided optimization of operating conditions

In order to improve purification process performance for the 4 mAbs that failed to meet the regulatory requirements, the specific reasons of failure were identified. The case of *Palivizumab* was addressed using configuration 1, which provided a higher purity (96 versus 92%, Table 4). As identified before, the reasons for this process' failure to meet FDA requirements were the aggregate content (specifically the dimers) and the concentration of leached protein-A. Consequently, CEX chromatography, which mainly targets aggregate removal, was analyzed in detail. As shown in Table 2, the CEX column was loaded at pH 5.5; nonetheless, at lower pH the equilibrium constant increases leading to better separation [27]. Model predictions suggest that improved *Palivizumab* separation can be achieved by reducing the loading pH from 5.5 to 4.2. This is anticipated to reduce the total concentration of aggregates and protein by 4 and 3 orders of magnitude, respectively, and to completely remove host cell proteins thus improving the yield of the process (Figure 5).



**Figure 5:** Impact of model-guided optimization of operating conditions (filled bars) on the separation of Palivizumab, Adalimumab, Eculizumab and Panitumumab in terms of (A) yield (blue) and purity (green), (B) total aggregates concentration, (C) total HCPs concentration and (D) leached Protein-A concentration compared to the platform strategy (blank bars). The FDA limits for each impurity are represented by red dashed lines.

Configuration 1 also resulted in higher *Adalimumab* purity than configuration 2 (99.93 versus 96.20%). Achieving more efficient HCPb and HCPc removal would result in the drug substance impurity concentrations falling below the regulatory limits. In order to improve HCP clearance, HIC chromatography was analyzed in detail, resulting in the decision to reduce the normalized salt gradient (GHs) from 0.05 M to 0.015 M. A small reduction in IEX loading pH (5.5 to 5.0) was also implemented. The model predicted that, under these changes, *Adalimumab* and HCPs can be efficiently separated with an additional benefit of a 10 percent-point yield improvement (Figure 5).

Neither of the two configurations tested could deliver compliant *Eculizumab* and *Panitumumab* products. In both cases, the aggregates and leached protein-A could not be effectively removed and, in the case of *Eculizumab*, the HCPs were also above the FDA limits.

For these two cases, a normalized salt gradient of 0.015M and an initial pH 4.2 were implemented together with the model predicting compliant drug substances for both mAbs. In both cases, aggregates and protein-A could be significantly reduced. The concentration of HCPs was slightly below the regulatory limit; model predictions identified further optimization be performed in order to obtain a reliable and robust process (Figure 5). DNA levels were not shown because, in all cases, this impurity was compliantly removed without the need of model-based optimization (Table 4) and no significant changes were observed following optimization (data not shown). Figure 5 demonstrated the feasibility of performing model-guided targeted modifications to a platform process in order to obtain compliance for a diverse range of molecules showcasing the usefulness of mathematical models in predicting separation efficiency for different species under varying operational parameters.

#### **4. Conclusions and Future Work**

Herein, axial fluid flow and mass transfer in small- and large-scale chromatography columns have been captured in an integrated mathematical model that enabled optimization of column dimensions and a more detailed description of mass transfer, which significantly depends on fluid flow. Purification of *Rituximab* was used to assess the performance of two process configurations comprising of affinity, CEX and HIC chromatography operations in series demonstrating agreement between model predictions and experimental trends. Subsequently, the model was applied to 14 mAbs with a joint 70% market share. Whereas the affinity-CEX-HIC configuration was predicted to deliver improved performance for all mAbs, in 4 cases the FDA purity requirements were not met. Model-guided optimization of the operating conditions was performed resulting in process modifications that delivered compliant drug-substances for all molecules tested. The model represents a useful tool for rapid assessment of different process conditions narrowing the design space, moving from platform to molecule-specific processes, and reducing process development time and cost. In addition, integration of upstream and downstream models would facilitate the development of plant-wide control strategies and enable model-based optimization of the whole process. In order for the model to be applied to a particular process, some process parameters would likely require re-estimation and validation with independent data sets would be required.

## 514 **Conflict of Interest**

515 The authors declare no conflict of interest.

516

## 517 **Acknowledgements**

518 AG and AM acknowledge financial support from the European Commission through the H2020 Marie-  
 519 Curie ITN ModLife (grant agreement 675251). AGG acknowledges the Spanish Ministry of Education  
 520 for his PhD fellowship (FPU14/04914) and the specific Fellowship for Short Stays from the Spanish  
 521 Ministry.

522

## 523 **Nomenclature**

### **Symbols**

$\Delta G^0$	Gibbs energy	(J/mol)
A	column cross sectional area	(m <sup>2</sup> )
$A_{\text{debye}}$	debye coefficient A	-
B	charge	-
c	Hazen-Williams coefficient (150 for chromatography columns)	
C	concentration in the mobile phase	(mol/L)
$D_{\text{ax}}$	axial dispersion coefficient	-
$D_{\text{eff}}$	effective diffusion coefficient inside particles	(m <sup>2</sup> /s)
$D_{\text{m}}$	molecular diffusion coefficient	(m <sup>2</sup> /s)
$F_{\text{in}}$	inlet flow rate	(L/s)
$F_{\text{out}}$	outlet flow rate	(L/s)
$GH_{\text{pH}}$	normalized pH gradient	-
$GH_{\text{s}}$	normalized salt gradient	(mol/L)
k	permeability coefficient	(m <sup>2</sup> )
$k_0$	Kozeny-Carman coefficient	(2.5 in SI units)
$K_{\text{a}}$	adsorption coefficient	(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
$K_{\text{d}}$	desorption coefficient	(s <sup>-1</sup> )
$K_{\text{f}}$	global mass transfer coefficient	(m/s)
L	length	(m)
M	amount of component in the fraction collected	(mol)
n	charge of the counter-ion in SMA model	-
P	pressure	(kg/m·s <sup>2</sup> )
Pe	Peclet number	-
$Q^*$	stationary phase equilibrium concentration	(mol/Lresin)
Q	stationary phase concentration	(mol/Lresin)
$Q_{\text{max}}$	maximum capacity of the resin	(mol/Lresin)
Re	Reynolds number	-
S	slope of the energy line	-
Sc	Schmidt number	-

T	Temperature	K
t	time	s
u	superficial velocity	(m/s)
v	global velocity	(m/s)
V	volume	(L)
z	axial coordinate	-

#### Greek letters

$\alpha$	salt coefficient	-
$\varepsilon$	porosity	-
$\mu$	fluid viscosity	Pa.s
$\rho$	fluid density	(kg/m <sup>3</sup> )
$\sigma$	steric factor	-
$\omega$	characteristic number of binding sites	-

#### Subscripts

c	column
e	equilibrium
fraction	fraction collected
i	component <i>i</i>
l	loading
p	resin particle
r	real
s	salt or solvation (energy or equilibrium constant)

524

#### 525 References

- 526 [1] Grilo, A. Mantalaris, A., The increasingly human and profitable monoclonal antibody market,  
527 Trends in Biotechnology (in-press). doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014
- 528 [2] Kroll, P., Hofer, A., Ulonska, S., Kager, J., Herwig, C., Model-Based Methods in the  
529 Biopharmaceutical Process Lifecycle, Pharm. Res. 34 (2017) 2596. doi:10.1007/s11095-017-  
530 2308-y
- 531 [3] Grilo, A., Mateus, M., Aires-Barros, M. R., and Azevedo, A.M., Monoclonal antibodies  
532 production platforms: an opportunity study of a non protein A chromatographic platform based  
533 on process economics, Biotech. J. 12 (2017) doi: 10.1002/biot.201700260
- 534 [4] S. Ghose, T. McNerney, B. Hubbard, Protein A affinity chromatography for capture and  
535 purification of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins: practical considerations for  
536 process development, in: A. Shukla, M. Etzel, S. Gadam (Eds.), Process Scale Biosep.  
537 Biopharm. Ind., CRC Press, 2007: pp. 463–489. doi:10.1201/9781420016024.
- 538 [5] S. Sommerfeld, J. Strube, Challenges in biotechnology production—generic processes and  
539 process optimization for monoclonal antibodies, Chem. Eng. Proc. 44 (2005) 1123–1137.  
540 doi:10.1016/j.cep.2005.03.006.
- 541 [6] P.A. Marichal-Gallardo, M.M. Alvarez, State-of-the-art in downstream processing of

- monoclonal antibodies: process trends in design and validation, *Biotechnol. Prog.* 28 (2012) 899–916. doi:10.1002/btpr.1567.
- [7] K. Westerberg, E. Broberg Hansen, M. Degerman, T. Budde Hansen, B. Nilsson, Model-based process challenge of an industrial ion-exchange chromatography step, *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 183–190. doi:10.1002/ceat.201000560.
- [8] S. Javeed, S. Qamar, W. Ashraf, G. Warnecke, A. Seidel-Morgenstern, Analysis and numerical investigation of two dynamic models for liquid chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 90 (2013) 17–31. doi:10.1016/j.ces.2012.12.014.
- [9] M.E. Lienqueo, A. Mahn, J.C. Salgado, C. Shene, Mathematical Modeling of Protein Chromatograms, *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 46–57. doi:10.1002/ceat.201100282.
- [10] R.N. Keener, E.J. Fernandez, J.E. Maneval, R.A. Hart, Advancement in the modeling of pressure-flow for the guidance of development and scale-up of commercial-scale biopharmaceutical chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1190 (2008) 127–140. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.113.
- [11] E.X. Perez-Almodovar, G. Carta, IgG adsorption on a new protein A adsorbent based on macroporous hydrophilic polymers. II. Pressure-flow curves and optimization for capture, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8348–8354. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.033.
- [12] F. Steinebach, M. Angarita, D.J. Karst, T. Müller-Späth, M. Morbidelli, Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production, *J. Chromatogr. A.* 1444 (2016) 50–56. doi:10.1016/j.chroma.2016.03.014.
- [13] S. Ergun, Fluid flow through packed columns, *Chem. Eng. Prog.* 48 (1952) 89–94. doi:citeulike-article-id:7797897.
- [14] R.G. Allen, Relating the Hazen-Williams and Darcy-Weisbach friction loss equations for pressurized irrigation, *Appl. Eng. Agric.* 12 (1996) 685–693.
- [15] S. Aldington, J. Bonnerjea, Scale-up of monoclonal antibody purification processes, *J. Chromatogr. B.* 848 (2007) 64–78. doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.032.
- [16] D.A. Nield, The limitations of the Brinkman-Forchheimer equation in modeling flow in a saturated porous medium and at an interface, *Int. J. Heat Fluid Flow.* 12 (1991) 269–272. doi:10.1016/0142-727X(91)90062-Z.
- [17] Z. Fang, Large scale chromatography columns, modeling flow distribution, in: M.C. Flickinger (Ed.), *Downstr. Ind. Biotechnol.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2013: pp. 353–372.
- [18] P.C. Carman, Fluid flow through granular beds, *Trans. Inst. Chem. Engineers.* 15 (1937) 150–166. doi:10.1016/S0263-8762(97)80003-2.
- [19] R. Hahn, R. Hahn, R. Schlegel, R. Schlegel, A. Jungbauer, A. Jungbauer, Comparison of protein-A affinity sorbents, *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* 790 (2003) 35–51.
- [20] K. Miyabe, A. Cavazzini, F. Gritti, M. Kele, G. Guiochon, Moment analysis of mass-transfer kinetics in C18-silica monolithic columns, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6975–6986. doi:10.1021/ac0302206.
- [21] T. Gu, *Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography with application examples*, 2nd ed., Springer, New York, 2015. doi:10.1007/978-3-319-16145-7.
- [22] J.S. Mackie, P. Mears, The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane . I Theoretical, *Proc. R. Soc. London A.* 232 (1955) 498. doi:10.1098/rspa.1983.0054.



- 584 [23] R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson, Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen  
585 interactions with a new biosensor based analytical system, *J. Immunol. Methods.* 145 (1991)  
586 229–240. doi:10.1016/0022-1759(91)90331-9.
- 587 [24] A. V. Patwardhan, M.M. Ataii, IMA chromatography of a cell extract: Effect of loading pH on  
588 protein purification, *AIChE J.* 43 (1997) 3232–3240. doi:10.1002/aic.690431211.
- 589 [25] K.A. Kang, D.D.Y. Ryu, Studies on scale-up parameters of an immunoglobulin separation  
590 system using protein-A affinity chromatography, *Biotechnol. Prog.* 7 (1991) 205–212.  
591 doi:10.1021/bp00009a002.
- 592 [26] C.A. Brooks, S.M. Cramer, Steric Mass-Action ion exchange : displacement profiles and  
593 induced salt gradients, *AIChE J.* 38 (1992) 1969–1978.
- 594 [27] S. Kluters, F. Wittkopp, M. Jöhnck, C. Frech, Application of linear pH gradients for the  
595 modeling of ion exchange chromatography: Separation of monoclonal antibody monomer from  
596 aggregates, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 663–675. doi:10.1002/jssc.201500994.
- 597 [28] T. Müller-Späth, G. Ströhlein, L. Aumann, H. Kornmann, P. Valax, L. Delegrange, E.  
598 Charbaut, G. Baer, A. Lamproye, M. Jöhnck, M. Schulte, M. Morbidelli, Model simulation  
599 and experimental verification of a cation-exchange IgG capture step in batch and continuous  
600 chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5195–5204.  
601 doi:10.1016/j.chroma.2011.05.103.
- 602 [29] L.K. Shekhawat, M. Chandak, A.S. Rathore, Mechanistic modeling of hydrophobic interaction  
603 chromatography for monoclonal antibody purification: process optimization in the quality by  
604 design paradigm, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2017). doi:10.1002/jctb.5324.
- 605 [30] J. Chen, Y. Sun, Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of  
606 protein, *J. Chromatogr. A.* 992 (2003) 29–40. doi:10.1016/S0021-9673(03)00277-2.
- 607 [31] E.A. Emini, J. V Hughes, D.S. Perlow, J. Boger, Induction of hepatitis A virus-neutralizing  
608 antibody by a virus-specific synthetic peptide., *J. Virol.* 55 (1985) 836–9. doi:imprimé.
- 609 [32] S. Lee, K.-H. Cho, Y.-M. Kang, H.A. Scheraga, K.T. No, A generalized G-SFED continuum  
610 solvation free energy calculation model, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) E662–E667.  
611 doi:10.1073/pnas.1221940110.
- 612 [33] W.R. Melander, Z. El Rassi, C. Horváth, Interplay of hydrophobic and electrostatic  
613 interactions in biopolymer chromatography. Effect of salts on the retention of proteins, *J.*  
614 *Chromatogr. A.* 469 (1989) 3–27. doi:10.1016/S0021-9673(01)96437-4.
- 615 [34] A.R. Mazzer, X. Perraud, J. Halley, J. O’Hara, D.G. Bracewell, Protein A chromatography  
616 increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation  
617 hold, *J. Chromatogr. A.* 1415 (2015) 83–90. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.068.
- 618 [35] J.N. Carter-Franklin, C. Victa, P. McDonald, R. Fahrner, Fragments of protein A eluted during  
619 protein A affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1163 (2007) 105–111.  
620 doi:10.1016/j.chroma.2007.06.012.
- 621 [36] K. Gustafson, Domain Decomposition, Operator Trigonometry, Robin Condition, *Contemp.*  
622 *Math.* 218 (1998) 432–437. doi:10.1090/conm/218.
- 623 [37] P.M. Morse, H. Feshbach, Boundary Conditions, in: *Methods Theor. Physics, Part I.*,  
624 McGraw-Hill, New York, 1953: p. 679.
- 625 [38] P. Gavara, N. Bibi, M. Sanchez, M. Grasselli, M. Fernandez-Lahore, Chromatographic  
626 characterization and process performance of column-packed anion exchange fibrous

- adsorbents for high throughput and high capacity bioseparations, *Processes*. 3 (2015) 204–221. doi:10.3390/pr3010204.
- [39] J.M.P.Q. Delgado, A critical review of dispersion in packed beds, *Heat Mass Transf. Und Stoffuebertragung*. 42 (2006) 279–310. doi:10.1007/s00231-005-0019-0.
- [40] C.E. Doneanu, A. Xenopoulos, K. Fadgen, J. Murphy, S.J. Skilton, H. Prentice, M. Stapels, W. Chen, Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, *MAbs*. 4 (2012) 24–44. doi:10.4161/mabs.4.1.18748.
- [41] G. Gaza-Bulseco, K. Hickman, S. Sinicropi-Yao, K. Hurkmans, C. Chumsae, H. Liu, Effect of the conserved oligosaccharides of recombinant monoclonal antibodies on the separation by protein A and protein G chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 2382–2387. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.014.
- [42] V. Law, C. Knox, Y. Djoumbou, T. Jewison, A.C. Guo, Y. Liu, A. Maclejewski, D. Arndt, M. Wilson, V. Neveu, A. Tang, G. Gabriel, C. Ly, S. Adamjee, Z.T. Dame, B. Han, Y. Zhou, D.S. Wishart, DrugBank 4.0: Shedding new light on drug metabolism, *Nucleic Acids Res*. 42 (2014) 1091–1097. doi:10.1093/nar/gkt1068.
- [43] V. Bronner, M. Tabul, T. Bayman, Protein interaction analysis, 2009. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5820A.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5820A.pdf).
- [44] P. Khandelwal, Practical Guide : Selecting the optimal resins for adenovirus process purification, Bio-Rad Tech Note 6875. (2016).
- [45] GE Healthcare, Three-step monoclonal antibody purification processes using modern chromatography media, (2015).
- [46] B.D. Connolly, C. Petry, S. Yadav, B. Demeule, N. Ciacchio, J.M.R. Moore, S.J. Shire, Y.R. Gokarn, Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions: High-throughput analysis using the diffusion interaction parameter, *Biophys. J*. 103 (2012) 69–78. doi:10.1016/j.bpj.2012.04.047.
- [47] R.M. Robertson, S. Laib, D.E. Smith, Diffusion of isolated DNA molecules: Dependence on length and topology, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 103 (2006) 7310–7314. doi:10.1073/pnas.0601903103.
- [48] B.E. Carlson, J.O. Vigoreaux, D.W. Maughan, Diffusion coefficients of endogenous cytosolic proteins from rabbit skinned muscle fibers, *Biophys. J*. 106 (2014) 780–792. doi:10.1016/j.bpj.2013.12.044.
- [49] M. Urmann, H. Graalfs, M. Joehnck, L.R. Jacob, C. Frech, Characterization of a novel stationary phase designed for production-scale purification cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies, (2010) 395–404. doi:10.4161/mabs.12303.
- [50] R.L. Fahrner, D.H. Whitney, M. Vanderlaan, G.S. Blank, Performance comparison of protein A affinity-chromatography sorbents for purifying recombinant monoclonal antibodies., *Biotechnol. Appl. Biochem*. 30 ( Pt 2) (1999) 121–128. doi:10.1111/j.1470-8744.1999.tb00902.x.
- [51] G. Carta, A. Jungbauer, *Chromatography Media*, in: *Protein Chromatogr.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010: pp. 85–124. doi:10.1002/9783527630158.ch3.
- [52] H.F. Liu, J. Ma, C. Winter, R. Bayer, Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, *MAbs*. 2 (2010) 480–499. doi:10.4161/mabs.2.5.12645.

- 671 [53] K. Swinnen, A. Krul, I. Van Goidsenhoven, N. Van Tichelt, A. Roosen, K. Van Houdt,  
672 Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal  
673 antibodies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 848 (2007) 97–107.  
674 doi:10.1016/j.jchromb.2006.04.050.
- 675 [54] P. Ng, G. Mitra, Removal of DNA contaminants from therapeutic protein preparations, *J.*  
676 *Chromatogr. A.* 658 (1994) 459–463. doi:10.1016/0021-9673(94)80036-7.
- 677 [55] S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, Ion-Exchange chromatography of proteins, CRC  
678 Press, Boca Raton, FL, 1988.
- 679 [56] T.M. Pabst, E.J. Suda, K.E. Thomas, P. Mensah, N. Ramasubramanyan, M.E. Gustafson, A.K.  
680 Hunter, Binding and elution behavior of proteins on strong cation exchangers, *J. Chromatogr.*  
681 *A.* 1216 (2009) 7950–7956. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.040.
- 682 [57] S. Schneider, Protein separation with pH gradients using composite buffer systems calculated  
683 by the agilent buffer advisor software, (2016).
- 684 [58] D.L. Nelson, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 6th ed., 2013.
- 685 [59] J.A. Gerstner, J.A. Bell, S.M. Cramer, Gibbs free energy of adsorption for biomolecules in  
686 ion-exchange systems, *Biophys. Chem.* 52 (1994) 97–106. doi:10.1016/0301-4622(94)00006-  
687 9.
- 688 [60] N. Borg, Y. Brodsky, J. Moscariello, S. Vunnum, G. Vedantham, K. Westerberg, B. Nilsson,  
689 Modeling and robust pooling design of a preparative cation-exchange chromatography step for  
690 purification of monoclonal antibody monomer from aggregates, *J. Chromatogr. A.* 1359  
691 (2014) 170–181. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.041.
- 692 [61] S. Ghose, Y. Tao, L. Conley, D. Cecchini, Purification of monoclonal antibodies by  
693 hydrophobic interaction chromatography under no-salt conditions, *MAbs.* 5 (2013) 795–800.  
694 doi:10.4161/mabs.25552.
- 695 [62] E. Haimer, A. Tscheliessnig, R. Hahn, A. Jungbauer, Hydrophobic interaction chromatography  
696 of proteins IV. Kinetics of protein spreading, *J. Chromatogr. A.* 1139 (2007) 84–94.  
697 doi:10.1016/j.chroma.2006.11.003.
- 698 [63] C.J.D. Fell, H.P. Hutchison, Diffusion Coefficients for Sodium and Potassium Chlorides in  
699 Water at Elevated Temperatures, *J. Chem. Eng. Data.* 16 (1971) 427–429.  
700 doi:10.1021/je60051a005.
- 701 [64] J.R. Conder, B.O. Hayek, Adsorption kinetics and equilibria of bovine serum albumin on rigid  
702 ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography matrices in a stirred cell, *Biochem.*  
703 *Eng. J.* 6 (2000) 215–223. doi:10.1016/S1369-703X(00)00091-7.
- 704 [65] N.J. Clark, H. Zhang, S. Krueger, H.J. Lee, R.R. Ketchem, B. Kerwin, S.R. Kanapuram, M.J.  
705 Treuheit, A. McAuley, J.E. Curtis, Small-angle neutron scattering study of a monoclonal  
706 antibody using free-energy constraints, *J Phys Chem B.* 117 (2013) 14029–14038.  
707 doi:10.1021/jp408710r.
- 708 [66] J.J. Stickel, A. Fotopoulos, Pressure-flow relationships for packed beds of compressible  
709 chromatography media at laboratory and production scale, *Biotechnol. Prog.* 17 (2001) 744–  
710 751. doi:10.1021/bp010060o.
- 711 [67] J.J. Milne, Strategies for the purification of membrane proteins, in: D. Walls, S.T. Loughran  
712 (Eds.), *Protein Chromatogr. Methods Protoc.*, Humana Press, New York, 2011: pp. 389–400.  
713 doi:10.1007/978-1-4939-6412-3\_21.

- 714 [68] N. Aboulaich, W.K. Chung, J.H. Thompson, C. Larkin, D. Robbins, M. Zhu, A novel approach  
715 to monitor clearance of host cell proteins associated with monoclonal antibodies, *Biotechnol.*  
716 *Prog.* 30 (2014) 1114–1124. doi:10.1002/btpr.1948.
- 717 [69] B. Kelley, Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a  
718 crossroads, *MAbs.* 1 (2009) 443–52. doi:10.4161/mabs.1.5.9448.
- 719 [70] R.L. Fahrner, H.L. Knudsen, C.D. Basey, W. Galan, D. Feuerhelm, M. Vanderlaan, G.S.  
720 Blank, Industrial purification of pharmaceutical antibodies: Development, operation, and  
721 validation of chromatography processes, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18 (2001) 301–327.  
722 doi:10.1080/02648725.2001.10648017.
- 723





## **Anexo I: Test estadístico sobre el efecto de los azúcares en la producción de polifruktosa por vía enzimática**

---

### **I.1. Significancia estadística de la concentración inicial de sacarosa**

Como se ha descrito en el Capítulo 5, se probaron diferentes concentraciones de sacarosa para realizar la catálisis, y producir polifruktosa. Se siguió el incremento de tamaños con el tiempo mediante DLS. Sin embargo, de cara a analizar si estos cambios son significativos se llevaron a cabo pruebas T con las quince últimas medidas de cada experimento (cuando el tamaño se considera que se ha estabilizado).

El test-T o prueba T de Student es una prueba en la que el estadístico sigue la distribución t de Student si la hipótesis nula es cierta. Suele emplearse para diferenciar si dos conjuntos de datos (que tienen distribución normal cada uno de ellos) son significativamente diferentes. Se distinguen dos tipos de pruebas T: de una o de dos colas.

En la prueba de una cola se reconoce la superioridad de la media de una muestra sobre la otra, es decir, asumiríamos desde el inicio, que, por ejemplo, la media de muestra A ha de ser superior a la media de la muestra B. En la prueba de dos colas, no se da por sentado esto, y cualquiera muestra puede tener dicha superioridad. En nuestro caso, dado que no podríamos prefijar ese criterio, se ha utilizado prueba de dos colas, con un nivel de significancia del 99% (p-valor 0.01). La hipótesis

nula planteada es: *hay diferencia significativa en los tamaños asociada a la concentración inicial de sacarosa.*

En la siguiente tabla se muestran los resultados arrojados para cada pareja de muestras con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa. Como se puede observar en la tabla, solamente dos comparaciones de concentraciones iniciales de sacarosa no muestran diferencias significativas tras el estadístico T de Student. No se aprecian diferencias significativas (marcadas en rojo) entre las concentraciones de 45 y 60 g/L, y en el caso de las concentraciones de 105 y 120 g/L. En el resto (marcadas en verde), los valores de T son inferiores a 0.01; y, por tanto, se puede concluir que hay diferencia significativa en los tamaños dependiendo de la concentración inicial de sacarosa, prevista al llevar a cabo la reacción.

Concentraciones iniciales sacarosa (g/L)	Valor t
45 vs. 60	0.13
45 vs. 75	7.68E-17
45 vs. 90	8.64E-20
45 vs. 105	1.14E-17
45 vs. 120	1.53E-26
60 vs. 75	6.54E-18
60 vs. 90	4.06E-20
60 vs. 105	1.66E-17
60 vs. 120	2.09E-27
75 vs. 90	1.52E-08
75 vs. 105	3.21E-12
75 vs. 120	1.17E-18
90 vs. 105	2.16E-07
90 vs. 120	2.03E-11
105 vs. 120	0.45



## I.2. Significancia estadística de la adición de azúcares extra al medio reaccionante.

Siguiendo la misma metodología presentada anteriormente, se estudió, por pares, si la adición de otros azúcares modifica el tamaño de las nanopartículas de polifruktosa. Se realizó un test estadístico T de Student de dos colas, donde la hipótesis nula fue la siguiente: *hay diferencia significativa en los tamaños asociada a la adición de otros azúcares.*

En la Tabla I.2 se muestran los resultados de dichos test para la adición extra de **GLUCOSA**, donde se ha considerado un nivel de confianza del 99% (p-valor 0.01). Los resultados muestran que la adición de glucosa es significativa en el tamaño de las partículas obtenidas mediante reacción enzimática. Solamente puede considerarse no-significativa la comparación entre el control (0 g/L) y la menor concentración adicionada (20 g/L). Aunque sí podría considerarse significativa, con mayor laxitud en el nivel de confianza.

Comparaciones con diferentes Concentraciones de glucosa extra	VALOR T
Control vs. 20 g/L	0.0178
Control vs. 40 g/L	0.0080
Control vs. 60 g/L	0.0014
20 g/L vs. 40 g/L	0.0001
20 g/L vs. 60 g/L	0.0001
40 g/L vs. 60 g/L	0.0002

En la Tabla I.3 se muestran los resultados de dichos test para la adición extra de **LACTOSA**, donde se ha considerado un nivel de confianza del 99% (p-valor 0.01). Los resultados muestran que la adición de lactosa es significativa para el tamaño de las partículas obtenidas mediante reacción enzimática. Solamente no es significativa si comparamos por pares, en las adiciones de 20 y 40 g/L de lactosa extra, donde el valor del estadístico T supera el p-valor prefijado. Se puede concluir que también la lactosa es capaz de modular el tamaño de las nanopartículas obtenidas mediante reacción enzimática.

<b>Comparaciones con diferentes Concentraciones de lactosa extra</b>	<b>VALOR T</b>
<b>Control vs. 20 g/L</b>	4.251E-08
<b>20 g/L vs. 40 g/L</b>	0.1010
<b>20 g/L vs. 60 g/L</b>	1.280E-09
<b>Control vs. 40 g/L</b>	6.572E-08
<b>Control vs. 60 g/L</b>	1.438E-11
<b>40 g/L vs. 60 g/L</b>	1.586E-10

## Anexo II: Estimación de la probabilidad de unión a ATP

---

A continuación, se presenta una tabla con los resultados de la simulación realizada para cada aminoácido, donde se observa que el único residuo con capacidad de unión a ATP es la lisina presente en la posición 8 (0.39 como resultado del *probability index*). La presencia o no de sitios de unión (*ATP Binding Sites*) viene expresada con dos letras: N significa negativo, mientras que P significa positivo. Solamente aparece un lugar positivo, como se ha comentado anteriormente, en la lisina de la posición 8.

Nº	Residuo	ATPbind Probability	ATPbind Binding Sites	Nº	Residuo	ATPbind Probability	ATPbind Binding Sites
1	M	0.011762	N	238	S	0.033580	N
2	N	0.006572	N	239	S	0.008629	N
3	I	0.011386	N	240	G	0.023894	N
4	K	0.033000	N	241	D	0.033653	N
5	K	0.030838	N	242	N	0.019525	N
6	F	0.011326	N	243	H	0.038566	N
7	A	0.032060	N	244	T	0.026233	N
8	K	0.390997	P	245	L	0.222661	N
9	Q	0.047354	N	246	R	0.061374	N
10	A	0.019566	N	247	D	0.141771	N
11	T	0.142461	N	248	P	0.062593	N
12	V	0.006843	N	249	H	0.229097	N
13	L	0.005780	N	250	Y	0.022269	N
14	T	0.006906	N	251	V	0.016828	N
15	F	0.057846	N	252	E	0.064718	N
16	T	0.015678	N	253	D	0.005651	N
17	T	0.005275	N	254	K	0.007082	N
18	A	0.003916	N	255	G	0.017368	N
19	L	0.005863	N	256	H	0.031799	N
20	L	0.008777	N	257	K	0.018405	N
21	A	0.009654	N	258	Y	0.010850	N
22	G	0.009688	N	259	L	0.026182	N
23	G	0.010568	N	260	V	0.012034	N

24	A	0.007942	N	261	F	0.011335	N
25	T	0.005543	N	262	E	0.107812	N
26	Q	0.007231	N	263	A	0.014530	N
27	A	0.000325	N	264	N	0.085208	N
28	F	0.010007	N	265	T	0.016457	N
29	A	0.004517	N	266	G	0.014985	N
30	K	0.002618	N	267	T	0.081269	N
31	E	0.007111	N	268	E	0.054997	N
32	T	0.006895	N	269	D	0.043149	N
33	N	0.006105	N	270	G	0.011405	N
34	Q	0.014142	N	271	Y	0.053553	N
35	K	0.006119	N	272	Q	0.046948	N
36	P	0.019012	N	273	G	0.034906	N
37	Y	0.036499	N	274	E	0.031963	N
38	K	0.043644	N	275	E	0.036238	N
39	E	0.024329	N	276	S	0.026631	N
40	T	0.028526	N	277	L	0.018507	N
41	Y	0.015445	N	278	F	0.022510	N
42	G	0.023516	N	279	N	0.034900	N
43	I	0.014741	N	280	K	0.046132	N
44	S	0.018100	N	281	A	0.020896	N
45	H	0.043835	N	282	Y	0.008346	N
46	I	0.006474	N	283	Y	0.011387	N
47	T	0.025658	N	284	G	0.024148	N
48	R	0.278840	N	285	K	0.017974	N
49	H	0.024009	N	286	S	0.003809	N
50	D	0.085858	N	287	T	0.004703	N
51	M	0.230322	N	288	S	0.010364	N
52	L	0.284401	N	289	F	0.066831	N
53	Q	0.037966	N	290	F	0.034174	N
54	I	0.014816	N	291	R	0.010441	N
55	P	0.026068	N	292	Q	0.004733	N
56	E	0.054986	N	293	E	0.010805	N
57	Q	0.007945	N	294	S	0.006137	N
58	Q	0.022564	N	295	Q	0.012472	N
59	K	0.021203	N	296	K	0.008845	N
60	N	0.036020	N	297	L	0.013213	N
61	E	0.013366	N	298	L	0.013100	N
62	K	0.032846	N	299	Q	0.008804	N
63	Y	0.055691	N	300	S	0.018618	N
64	Q	0.014797	N	301	D	0.003875	N
65	V	0.050206	N	302	K	0.008883	N
66	P	0.011898	N	303	K	0.013998	N

67	E	0.017847	N	304	R	0.017863	N
68	F	0.014971	N	305	T	0.012321	N
69	D	0.007133	N	306	A	0.007112	N
70	S	0.004918	N	307	E	0.023510	N
71	S	0.004326	N	308	L	0.070638	N
72	T	0.003628	N	309	A	0.021870	N
73	I	0.020557	N	310	N	0.046495	N
74	K	0.005299	N	311	G	0.049036	N
75	N	0.016741	N	312	A	0.182847	N
76	I	0.009547	N	313	L	0.054322	N
77	S	0.025144	N	314	G	0.123833	N
78	S	0.020661	N	315	M	0.028807	N
79	A	0.027690	N	316	I	0.008890	N
80	K	0.005436	N	317	E	0.081299	N
81	G	0.012862	N	318	L	0.007240	N
82	L	0.019163	N	319	N	0.029674	N
83	D	0.070846	N	320	D	0.004251	N
84	V	0.027660	N	321	D	0.005531	N
85	W	0.164029	N	322	Y	0.007172	N
86	D	0.196984	N	323	T	0.009466	N
87	S	0.045817	N	324	L	0.015465	N
88	W	0.041326	N	325	K	0.015701	N
89	P	0.022080	N	326	K	0.014323	N
90	L	0.008666	N	327	V	0.015445	N
91	Q	0.013461	N	328	M	0.014516	N
92	N	0.007131	N	329	K	0.024685	N
93	A	0.007757	N	330	P	0.032777	N
94	D	0.020970	N	331	L	0.182162	N
95	G	0.024980	N	332	I	0.054899	N
96	T	0.019431	N	333	A	0.014906	N
97	V	0.012751	N	334	S	0.011949	N
98	A	0.010353	N	335	N	0.034323	N
99	N	0.016747	N	336	T	0.009958	N
100	Y	0.019375	N	337	V	0.017600	N
101	H	0.020276	N	338	T	0.019166	N
102	G	0.041815	N	339	D	0.051748	N
103	Y	0.053434	N	340	E	0.070573	N
104	H	0.018713	N	341	I	0.049106	N
105	I	0.008041	N	342	E	0.256207	N
106	V	0.008539	N	343	R	0.090027	N
107	F	0.007871	N	344	A	0.029534	N
108	A	0.004188	N	345	N	0.067966	N
109	L	0.008302	N	346	V	0.017165	N

110	A	0.014936	N	347	F	0.030485	N
111	G	0.014604	N	348	K	0.030023	N
112	D	0.017645	N	349	M	0.017267	N
113	P	0.029336	N	350	N	0.008306	N
114	K	0.015826	N	351	G	0.018313	N
115	N	0.020225	N	352	K	0.018666	N
116	A	0.020976	N	353	W	0.022790	N
117	D	0.035821	N	354	Y	0.027047	N
118	D	0.017892	N	355	L	0.021470	N
119	T	0.043754	N	356	F	0.050041	N
120	S	0.025757	N	357	T	0.025803	N
121	I	0.014548	N	358	D	0.128020	N
122	Y	0.049388	N	359	S	0.148438	N
123	M	0.009628	N	360	R	0.184290	N
124	F	0.027610	N	361	G	0.022083	N
125	Y	0.037545	N	362	S	0.020143	N
126	Q	0.083767	N	363	K	0.026404	N
127	K	0.055147	N	364	M	0.008876	N
128	V	0.144397	N	365	T	0.016116	N
129	G	0.047867	N	366	I	0.017303	N
130	E	0.026929	N	367	D	0.026456	N
131	T	0.020553	N	368	G	0.008777	N
132	S	0.025694	N	369	I	0.022526	N
133	I	0.218812	N	370	T	0.020634	N
134	D	0.034833	N	371	S	0.021799	N
135	S	0.054323	N	372	N	0.014729	N
136	W	0.056622	N	373	D	0.005806	N
137	K	0.054013	N	374	I	0.020878	N
138	N	0.066841	N	375	Y	0.015590	N
139	A	0.026526	N	376	M	0.015997	N
140	G	0.055334	N	377	L	0.029883	N
141	R	0.032772	N	378	G	0.018051	N
142	V	0.019640	N	379	Y	0.020163	N
143	F	0.008896	N	380	V	0.062338	N
144	K	0.007888	N	381	S	0.046441	N
145	D	0.006017	N	382	N	0.123722	N
146	S	0.002281	N	383	S	0.019309	N
147	D	0.004040	N	384	L	0.019016	N
148	K	0.006700	N	385	T	0.021140	N
149	F	0.006835	N	386	G	0.016811	N
150	D	0.004863	N	387	P	0.011830	N
151	A	0.023514	N	388	Y	0.028291	N
152	N	0.014677	N	389	K	0.020654	N

153	D	0.005651	N	390	P	0.031160	N
154	S	0.002561	N	391	L	0.046405	N
155	I	0.016572	N	392	N	0.022656	N
156	L	0.011053	N	393	K	0.068220	N
157	K	0.006246	N	394	T	0.026816	N
158	D	0.008979	N	395	G	0.025089	N
159	Q	0.022962	N	396	L	0.008741	N
160	T	0.049974	N	397	V	0.028866	N
161	Q	0.054897	N	398	L	0.007695	N
162	E	0.055985	N	399	K	0.034027	N
163	W	0.242429	N	400	M	0.007704	N
164	S	0.164883	N	401	D	0.004097	N
165	G	0.161020	N	402	L	0.009601	N
166	S	0.034265	N	403	D	0.012534	N
167	A	0.023221	N	404	P	0.009117	N
168	T	0.042141	N	405	N	0.015718	N
169	F	0.042559	N	406	D	0.029143	N
170	T	0.037355	N	407	V	0.108943	N
171	S	0.016032	N	408	T	0.062364	N
172	D	0.015749	N	409	F	0.062206	N
173	G	0.027552	N	410	T	0.106813	N
174	K	0.058199	N	411	Y	0.092610	N
175	I	0.045616	N	412	S	0.020086	N
176	R	0.043700	N	413	H	0.031377	N
177	L	0.010095	N	414	F	0.021699	N
178	F	0.023304	N	415	A	0.008565	N
179	Y	0.021248	N	416	V	0.000542	N
180	T	0.019315	N	417	P	0.002830	N
181	D	0.010250	N	418	Q	0.002618	N
182	F	0.013323	N	419	A	0.002947	N
183	S	0.011437	N	420	K	0.006552	N
184	G	0.004881	N	421	G	0.000008	N
185	K	0.006849	N	422	N	0.005020	N
186	H	0.005176	N	423	N	0.012773	N
187	Y	0.006479	N	424	V	0.011455	N
188	G	0.004325	N	425	V	0.013568	N
189	K	0.009310	N	426	I	0.005839	N
190	Q	0.027459	N	427	T	0.013316	N
191	T	0.050032	N	428	S	0.015069	N
192	L	0.031832	N	429	Y	0.019221	N
193	T	0.049337	N	430	M	0.025679	N
194	T	0.012219	N	431	T	0.006770	N
195	A	0.007101	N	432	N	0.010031	N

196	Q	0.008614	N	433	R	0.017822	N
197	V	0.005117	N	434	G	0.008119	N
198	N	0.009477	N	435	F	0.016299	N
199	V	0.004789	N	436	Y	0.011605	N
200	S	0.007275	N	437	A	0.008407	N
201	A	0.022575	N	438	D	0.011615	N
202	S	0.011413	N	439	K	0.016996	N
203	D	0.049719	N	440	Q	0.023526	N
204	S	0.008573	N	441	S	0.029885	N
205	S	0.016054	N	442	T	0.055350	N
206	L	0.015758	N	443	F	0.052263	N
207	N	0.012417	N	444	A	0.055495	N
208	I	0.020056	N	445	P	0.110818	N
209	N	0.015391	N	446	S	0.087331	N
210	G	0.014740	N	447	F	0.011077	N
211	V	0.061439	N	448	L	0.043477	N
212	E	0.064987	N	449	L	0.006223	N
213	D	0.043425	N	450	N	0.019246	N
214	Y	0.029027	N	451	I	0.002125	N
215	K	0.019582	N	452	K	0.003734	N
216	S	0.016978	N	453	G	0.007812	N
217	I	0.015504	N	454	K	0.019325	N
218	F	0.036933	N	455	K	0.011748	N
219	D	0.036752	N	456	T	0.014028	N
220	G	0.042915	N	457	S	0.017950	N
221	D	0.044075	N	458	V	0.024619	N
222	G	0.045338	N	459	V	0.008710	N
223	K	0.036082	N	460	K	0.019262	N
224	T	0.021137	N	461	D	0.004736	N
225	Y	0.028972	N	462	S	0.022239	N
226	Q	0.033064	N	463	I	0.015815	N
227	N	0.020666	N	464	L	0.030820	N
228	V	0.012835	N	465	E	0.018639	N
229	Q	0.012510	N	466	Q	0.024266	N
230	Q	0.031398	N	467	G	0.013492	N
231	F	0.014328	N	468	Q	0.026878	N
232	I	0.011539	N	469	L	0.017570	N
233	D	0.001904	N	470	T	0.019880	N
234	E	0.016581	N	471	V	0.014369	N
235	G	0.006767	N	472	N	0.012851	N
236	N	0.014574	N	473	K	0.016485	N
237	Y	0.021975	N				

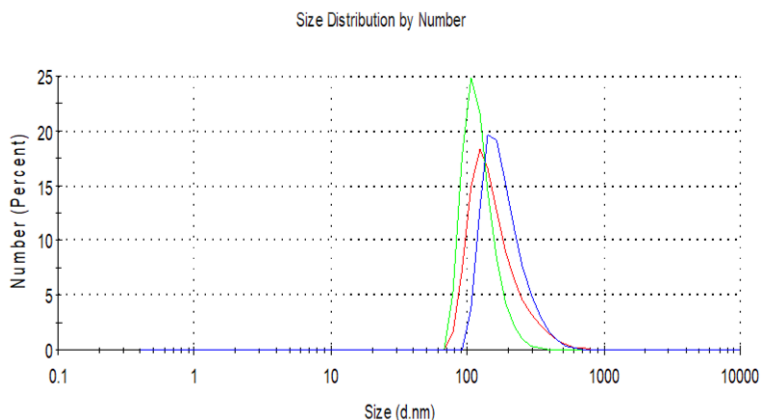


## Anexo III: Caracterización de las nanopartículas obtenidas con el polímero comercial. Comparación entre sistemas

---

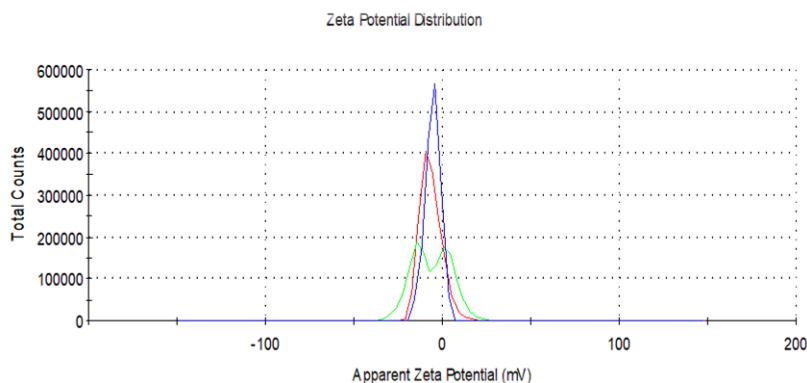
### III.1. Tamaño de partícula

Utilizando los métodos descritos anteriormente se procedió a determinar el tamaño de partícula con el polímero obtenido de forma comercial. En la figura siguiente se representa la distribución de tamaño de partícula para los tres sistemas estudiados. El polímero comercial está representado en rojo, mientras que el obtenido de forma enzimática está representado en verde, y el obtenido de forma microbiana está representado en azul. Se puede apreciar que no hay diferencias importantes en cuanto a la distribución de tamaño de partícula, y en todos los casos, se sitúa en el intervalo de 100 a 200 nm.



### III.2. Zeta potencial

Por otra parte se caracterizó la carga superficial de las nanopartículas y se comparó con la obtenida para aquellas formadas por el polímero obtenido de forma comercial y de forma enzimática. En la siguiente gráfica se representa la distribución de carga para los tres casos, que siguen la misma relación de colores que la expuesta anteriormente. Se puede observar que no hay una diferencia importante en la carga superficial de las nanopartículas, que en todos los casos toman un valor muy próximo a cero (alrededor de -4 mV).

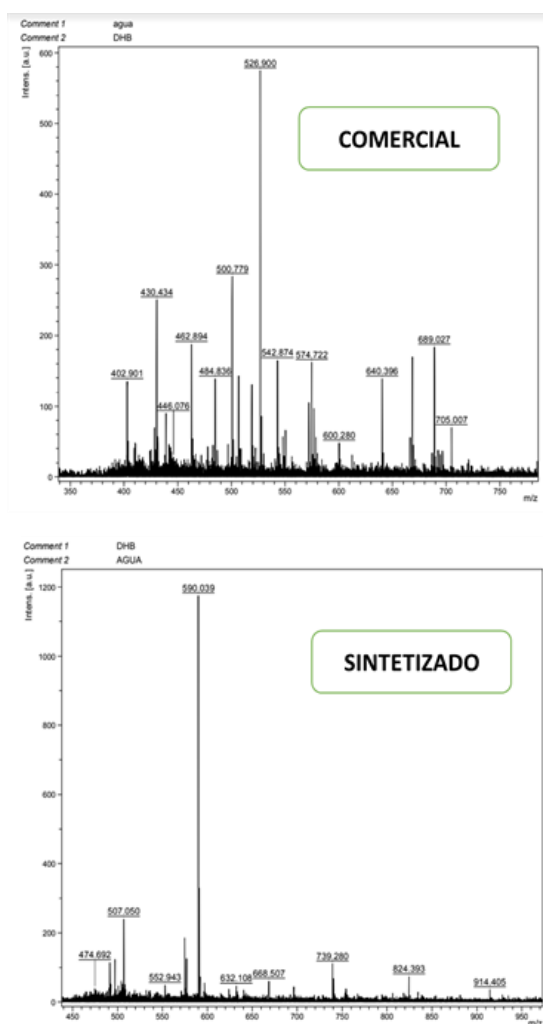


### III.3. Segundo coeficiente del virial

Se calculó el segundo coeficiente del virial para las nanopartículas producidas desde el polímero comercial, y se obtuvo un valor de  $7.35 \cdot 10^{-6} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ , que es un valor que se sitúa entre los valores obtenidos para el leván de origen microbiano ( $1.69 \cdot 10^{-5} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ ) y el leván de origen enzimático ( $6.07 \cdot 10^{-6} \text{ mL} \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ ).

### III.4. Peso molecular

De igual forma, se estudió el peso molecular del polímero mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados ofrecen un rango de pesos moleculares semejantes al polímero obtenido desde la síntesis enzimática, pero sí se observa una mayor heterogeneidad en los pesos moleculares obtenidos (ver imagen inferior), sin que destaque de forma sobresaliente un pico sobre el resto.





**Publicaciones  
derivadas  
de la tesis doctoral**

---



- ✚ **Levan and levansucrases: Polymer, enzyme, microorganisms and biomedical applications.** Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, A. Domínguez, M.A. Galán, E.M. Martín del Valle. *Biocatalysis and Biotransformation* 36(3), 233-244. Año 2018.
  
- ✚ **Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight.** Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E. M. Martín del Valle. *Microbial Cell Factories* 16(1), 91. Año 2017.
  
- ✚ **Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies.** A. Tabernero, A. González-Garcinuño, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E. Martín del Valle. *Carbohydrate Polymers* 160, 26-33. Año 2017.
  
- ✚ **Levan-capped silver nanoparticles for bactericidal formulations: Release and activity modelling.** Á. González-Garcinuño, R. Masa, M. Hernández, A. Domínguez, A. Tabernero, E. M. Martín del Valle. *International Journal of Molecular Sciences* 20(6), 1502.
  
- ✚ **Biotechnological strategies to produce levan: Mass transfer and techno-economical evaluation.** Á. González-Garcinuño, S. Ruiz, A. Sánchez-Muñoz, A. Tabernero, E. Martín del Valle. *Chemical Engineering and Processing* 141, 107529. Año 2019.
  
- ✚ **Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: microbial vs. cell-free systems.** Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, G. Marcelo, V. Sebastián, M. Arruebo, J. Santamaría, E.M. Martín del Valle. *International Journal of Biological Macromolecules* 137, 62-68. Año 2019.







RESEARCH ARTICLE



## Levan and levansucrases: Polymer, enzyme, micro-organisms and biomedical applications

Álvaro González-Garcinuño<sup>a</sup>, Antonio Tabernero<sup>a</sup>, Ángel Domínguez<sup>b</sup>, Miguel A. Galán<sup>a</sup> and Eva M. Martín del Valle<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>b</sup>Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Salamanca, Spain

### ABSTRACT

Nowadays, levan synthesis and its biocatalysis is a step claiming attention due to its promising uses in biomedical field. Levansucrase, as the enzyme responsible of levan biocatalysis is studied in this work concerning sequence homology, signal peptide, metal binding, etc. More than 650 different levansucrase sequences were studied and many interesting results were obtained such as phylogenetic trees and conserved residues that could be essential for biocatalysis machinery. Moreover, a review of levan applications in biomedicine and health field was made. It is showed the advances in applications such as a film agent, a carrier for drug delivery systems, an anti-inflammatory compound or its potential use for functional food as prebiotic.

### ARTICLE HISTORY

Received 27 January 2017  
Revised 10 March 2017  
Accepted 26 March 2017

### KEYWORDS

Levan; biomedicine;  
phylogenetic tree;  
levansucrase; sequence  
alignment

### Introduction

Levan is a  $\beta$ -(2,6)-linked fructose polymer with an unusual combination of properties obtained from both plants and micro-organisms. Microbial levans have numerous applications in the food industry, or in the cosmetic and pharmaceutical industries. Levan polymers have recently been reported to be yielded by many micro-organisms, including G<sup>+</sup> and G<sup>−</sup> genera, *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, etc. through the action of levansucrase enzyme (Han, 1990; Naumoff 1999; Öner et al. 2016). Some genera, i.e. *Bacillus* (Abdel-Fattah et al. 2005) produced both inducible and constitutive levansucrases, while others produced essentially a constitutive enzyme. Its wide range of application made of levan a multiuse biomaterial with relevant utility in nanotechnology and in the preparation of novel nanocomposites. Despite of all this applications, it is scarcely produced and none a favourite micro-organism have been established for producing the enzyme or the polymer. Even more, there are not feasible standard protocols for the production and purification of the levan exopolysaccharide. In this work, we describe potential new bacterial genera with sequenced levansucrases. A bottleneck

about the knowledge of levansucrases and its synthesis is the lack of data of omic's technology (transcriptomic and proteomic) that must be improved. Besides, at the end, it is shown the main applications of levan in biomedicine.

### Levan biocatalysis

#### Polymer synthesis and production

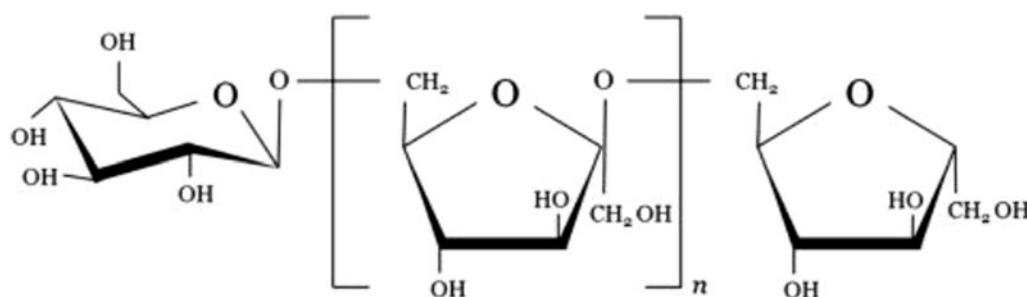
The levan microbial biosynthesis, which are usually obtained by using sucrose as substrate (Monsan et al. 2001; Shih et al. 2010), is a step-by-step process which starts with the transfer of a hexosyl group from a donor molecule to a growing acceptor molecule. Single fructofuranosyl units are added to the C6 hydroxyl of the non-reducing fructose terminal unit of a growing levan polysaccharide chain (Meng and Fütterer 2008; Cuskin et al. 2012; Srikanth et al. 2015). The shortest levan is 6-kestose, essentially a chain of three residues (two fructoses and the initial hexose) and from it, bigger levan chains are synthesized. Figure 1 represents levan structure.

After this, the polymer molecule grows up to millions of residues (Ullrich, 2009). Data about its chemical structure have recently being reviewed

**CONTACT** Eva Martín del Valle ✉ emvalle@usal.es 📧 Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza Los Caidos s/n, 37008 Salamanca, Spain

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



**Figure 1.** Structure of levan.

(Srikanth et al. 2015; Öner et al. 2016). The characterization of the polymer and of its molecular structure is of essential interest for its utilization. This must be performed exhaustively by available techniques, such as gel permeation chromatography (GPC), light scattering techniques, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet–visible spectroscopy; Raman spectroscopy, X-ray diffraction and mass spectroscopy.

The production of levan by bacteria is mainly carried out using submerged fermentation techniques (Öner et al. 2016). The parameters involved in its production are mainly, temperature which depends on the bacterial strain varying from 23 °C, *Zyomonas mobilis* (Han et al. 2009) to 55 °C for *Bacillus subtilis* (Park et al. 2005). Optimal pH varies between 5 and 7 (Li et al. 2015; Srikanth et al. 2015). More factors to be considered are sucrose concentration, incubation time, ionic strength, etc.

As with many other proteins and polymers; recombinant techniques and many micro-organisms have been used to produce levansucrase and levan. In bacteria, it is *Escherichia coli* the organism of election but as in many other cases, the use of strong promoters produced inclusion bodies reducing the yield and thus attempts to express the enzyme under constitutive promoters have been developed (Alamäe et al. 2012). In *Bacillus megaterium*, a vector with an inducible promoter by xylose was used to produce levansucrase producing an increase in the secreted enzyme (Korneli et al. 2013). Levansucrases of bacteria (*Z. mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Gluconoacetobacter diazotrophicus*) have been expressed in yeast (*Hansenula polymorpha* (Seek Parka et al. 2004), *Saccharomyces cerevisiae* (Franken et al. 2013) and *Pichia pastoris* (Trujillo et al. 2001), respectively) but no higher increase in levan sucrose production have been obtained. All the three yeast have the GRAS (Generally Recognized As Safe) status which represents an enormous advantage if the polymer are going to be used in humans. Finally, in an interesting

work, Esawy et al. (2013) have studied the scaling-up process with successful results.

### The enzyme and the gene

The enzymes, levansucrases, are extracellular enzymes. Most of the bacterial species contain a unique levansucrase gene and in the operon it is usually the first one. Few data exist about the structure and about the regulating region of the promoter, one of the drawbacks in the field, being the exception *B. subtilis* in which it has been described that the operon is regulated by a sucrose-inducible antitermination mechanism (Crutz et al. 1990). Levansucrose usually presents constitutive expression in those bacterial genera which natural habitat contains sucrose like *Actinomyces*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Zymomonas*, etc. while in genera growing in other habitats, its expression requires an inductor, mainly sucrose. In some cases repression by glucose has been described (Menéndez et al. 2009). A strong control of the enzyme transcriptional level guarantees the prevalence of levan synthesis over degradation when the substrate sucrose is available.

The enzyme is synthesized in the cytoplasm, it is accumulated in the periplasm where it adopts its final conformation before being secreted. Levansucrases can remain attached to the cell surface or release to the external media. The utilization of the secretory pathways is under controversy. It seems clear that in some Gram+ secretion involves cleavage of signal-peptide containing precursors by the classical secretory pathway (Sec type) but in this work, we show that several G<sup>−</sup> genera also contain the signal peptide (see Table 1). Also we described that several G<sup>+</sup> and the majority of G<sup>−</sup> genera lack of canonical signal peptide. This suggests the existence of a secretory different (new?) pathway not yet characterized. An exception is *G. diazotrophicus* in which levansucrases are secreted by a type-II secretory mechanism (Arrieta et al. 2004).

Table 1. Bacteria genera with sequenced levansucrases.

Bacterial genera	Species number detected	Gram	SP
Acetobacter	2	—	NO
Acinetobacter	2	—	NO
Actinomyces	14	+	YES
Agromyces	2	+	YES
Alteribacillus	1	+	YES
Altererythrobacter	2	—	NO
Anaerobacillus	1	+	YES
Arsenophonus	3	—	NO
Arthrobacter	40	+	YES
Asaia	2	—	YES
Azotobacter	3	—	YES
Bacillus	58	+	YES
Beijerinckia	1	—	YES
Blastomonas	6	—	NO
Brachybacterium	2	+	YES
Brenneria	2	—	NO
Brevibacillus	2	+	YES
Brevibacterium	1	+	YES
Burkholderia	57	—	YES
Candidatus Thiomargarita	1	—	YES
Caulobacter	4	—	NO
Cellulomonas	8	+	YES
Cellulosimicrobium	1	+	YES
Clavibacter	2	+	YES
Clostridium	5	±	YES
Cosenzaea	1	—	NO
Croceicoccus	1	—	NO
Cryobacterium	1	—	YES
Cupriavidus	2	—	YES
Deinococcus	1	+	YES
Desulfovibrio	1	—	NO
Domibacillus	1	+	YES
Dyella	1	—	YES
Erwinia	3	—	NO
Erythrobacter	12	—	NO
Ethanoligenens	1	+	YES
Fictibacillus	3	+	YES
Fontibacillus	1	+	YES
Fructobacillus	5	+	NO
Gibbsiella	3	—	NO
Gluconobacter	10	—	NO
Haladaptatus	4	—	NO
Halalkalicoccus	2	—	NO
Haloarcula	10	—	NO
Halobacillus	7	+	YES
Halobellus	1	—	NO
Haloferax	8	+	NO
Halogeometricum	3	—	NO
Halogranum	3	—	NO
Halohasta	1	—	NO
Halomicrobium	3	—	NO
Halomonas	1	—	NO
Halopelagius	2	—	NO
Halopenitus	1	—	NO
Haloprofundus	1	—	NO
Halorubrum	9	—	NO
Halostagnicola	2	—	NO
Haloterrigena	3	—	YES
Herbidospora	5	+	NO
Kibdelosporangium	1	+	NO
Komagataeibacter	2	—	NO
Kozakia	1	—	NO
Lactobacillus	24	+	YES
Lechevalieria	1	+	NO
Leuconostoc	5	+	YES
Leuconostocaceae	1	+	NO
Lonsdalea	1	—	NO
Marinobacterium	1	—	YES
Microbacterium	8	+	NO
Microbispora	2	+	NO
Natrialba	3	+	NO
Natronococcus	2	+	NO

(continued)

Table 1. Continued

Bacterial genera	Species number detected	Gram	SP
Nonomuraea	6	+	NO
Novosphingobium	27	—	NO
Oenococcus	2	+	NO
Paenarthrobacter	2	+	NO
Paenibacillus	38	+	YES
Paenisporosarcina	1	+	YES
Pantoea	1	—	NO
Paraburkholderia	5	—	YES
Pectobacterium	1	—	NO
Phaseolibacter	1	—	NO
Pontibacillus	2	+	NO
Porphyrobacter	7	—	NO
Promicromonosporaceae	1	+	YES
Pseudoalteromonas	3	+	YES
Pseudarthrobacter	5	+	YES
Pseudomonas	77	—	NO
Rahnella	2	—	NO
Rhodococcus	1	+	NO
Roseibacterium	1	—	YES
Roseinatronobacter	1	—	NO
Rothia	1	+	YES
Sandarakinorhabdus	1	—	NO
Serratia plymuthica	5	—	NO
Solirubrobacterales	1	+	NO
Sphingobium	15	—	NO
Sphingomonas	36	—	NO
Sphingopyxis	3	—	NO
Sporolactobacillus	3	+	YES
Streptococcus	20	+	YES
Streptomyces	15	+	YES
Tanticharoenia	2	—	NO
Tatumella	4	—	NO
Terribacillus	3	+	YES
Tolomonas	1	—	YES
Vibrio	3	—	YES
Zymomonas	2	—	NO

G: Gram staining; SP: signal peptide.

## Microbial levanes. Bioinformatics study

### Methods

#### Sequence data

Overall protein sequences obtained by BlastP comparisons against the database of non-redundant protein sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with the well-characterized levansucrases of *B. subtilis* and *Z. mobilis* and based on high levels of similarity and/or a large functional homogeneity of the hits, we have detected the 685 strains of bacteria, Gram positive and Gram negative, in this study (Supplementary Table 1). The alignment of proteins was generated by using the Clustal Omega Program (<http://www.ebi.ac.uk/services>)

#### Construction of phylogentic trees

Alignment of amino acid sequences were carried out by HMMER package against the corresponding profile hidden Markov models. Phylogenetic trees from alignments of protein sequences were constructed by

FastTree version 2.1.4 by maximum-likelihood methods (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>) (Price et al. 2009). The tree data were submitted to iTOL (<http://itol.embl.de/upload.cgi>) for viewing phylogenetic trees and making figures (Letunic and Bork 2007).

## Results

Using the *Z. mobilis* and the *B. subtilis* levansucrases as references, we have been able to analyze, in this work, a total of 684 strains of bacterial species containing fully sequenced levansucrases. All of them show a degree of identity higher than E – 10 (Supplementary Table 1). The bacteria species belong to 107 bacterial genera. Sixty-one species are Gram negative (G–) and 46 Gram positive (G+) suggesting that the enzyme is widely distributed in nature. The genera with more species are *Actinomyces* (8), *Bacillus* (27), *Burkholderia* (20), *Gluconobacter* (9), *Lactobacillus* (14), *Novosphingobium* (12), *Paenibacillus* (20), *Pseudomonas* (28), *Sphingomonas* (12) and *Streptomyces* (13), which also correspond to those genera with more strains sequenced. The size of the proteins ranges from 783 amino acids (*Lactobacillus*) to 356 amino acids (*Gibbsiella*). Thirty species of the G+ (65%) and 14 (23%) of the G– genera contain signal peptide (SP) indicating a higher tendency to use the classical secretory pathway in the Gram+ bacteria (Table 1).

In all the cases, Alanine (A) is the amino acid occupying the –1 position for the signal peptidase, being also Alanine the preferred amino acid in position +1 (16 peptides, 37%). The rest of +1 position is occupied by 10 different amino acids. Another distinctive feature is the length of the signal peptide, in general the SP of the G+ bacteria are longer (between 3 and 6 amino acids) than those of the G– bacteria. How this fact is a consequence of the different composition of the cell wall or affects the secretory capacities or the regulatory mechanisms implicated is the synthesis of the enzyme remains to be elucidated. The distribution of levansucrase genes from the tested bacteria can be divided into at least eight putative clades for studying their protein features as it is shown in Figure 2.

Four corresponds to G+ Bacteria and four to G– Bacteria. The largest one G+ clade contains 18 genera and the largest G– clade contains 21 genera. Surprisingly, several genera of G+ Bacteria, i.e. *Natronococcus*, *Deinococcus*, appeared intercalated into G– clades. Whether this is the result of the lack of enough genera sequences, of structural distinctive features of the enzyme, or of acquisition of the enzyme by horizontal gene transfer are being investigated. Clade I with three main branches contained the higher

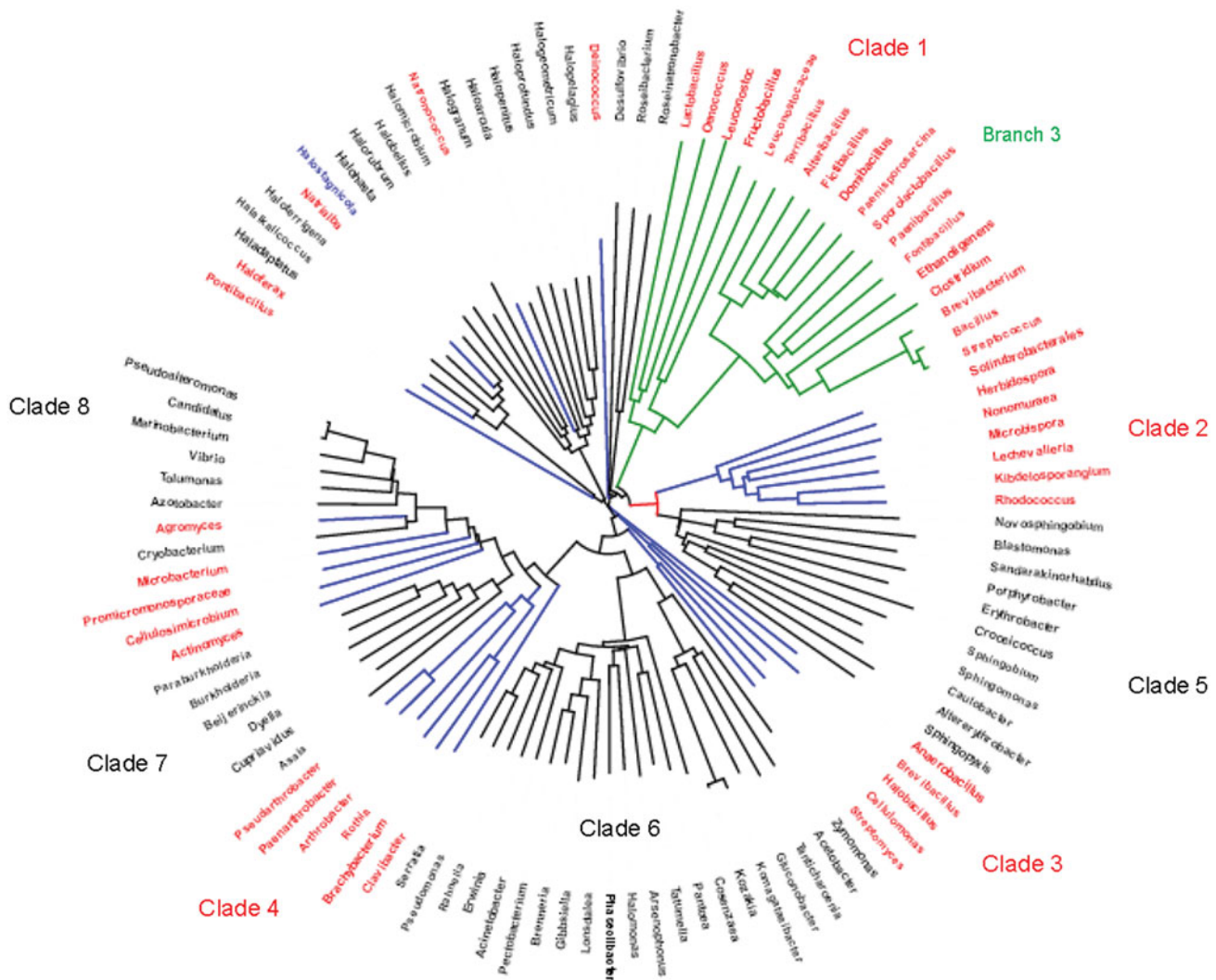
amount of levansucrases and in one branch (branch 3) all of the genera contain signal peptide. Also in clade 3 and in clades 4 and 5, all the genera contain signal peptide (except *Paenarthrobacter*, clade 4 and *Microbacterium*, clade 5). However, in clade 2, none of the species contains signal peptide. A similar situation is observed after analyzing the G– clades. The genera included in clades 5 and 6 lack of signal peptides while all those genera in clades 7 and 8 contained it. The distribution of all other genera containing signal peptide does not present a clade clear patron. It must be pointed out that although some genera lacks of signal peptide the enzyme, either in its natural expression or cloned in *E. coli*, appeared in higher amounts in the periplasm (Eun-Kyung et al. 2002). In addition, a correspondence between the protein size and the clades exits.

An alignment by using the Clustal Omega and PSI-BLAST programs shows that levansucrases of the representative clades of G+ and G+ genera are related in at least 17 regions in the whole sequence except in the N-terminal part of the proteins. In our alignment at 36 aminoacids are totally aligned in all the proteins and eight blocks contains more than 14 aminoacids. Our results are in agreement with those presented by Naumoff (1999) showing as consensus the sequences VFKMNG–YLF and Y-SNS-LGTPYKPLN-KTGLVL. Both sequences are included in our boxes 13 and 14 although a small distortion appeared in due to the existence of four extra amino acids in *Arthrobacter*. Also there is a consensus between our results and those described by Eun-Kyung et al. (2002). Several authors have described the active centre of levansucrases in *B. subtilis* (Meng and Fütterer 2003), *B. megaterium* (Strube et al. 2011), *Erwinia amylovora* (Wuerges et al. 2015) and *G. diazotrophicus* (Martinez-Fleites et al. 2005). The amino acids identified and their positions in the *B. subtilis* sequence are Asp86, Ser164, Arg246, Asp247, Glu262Glu340, Glu342, Arg343, Arg360 and Tyr411. All of then appeared in the genera analyzed in this work (Figure 3, arrows).

Exceptions are *Streptomyces* and *Cellulomonas* which in positions 164 serine (Ser) is substituted by alanine (Ala), and in position 340, where glutamic is present only in *Bacillus* and *Clostridium* being substituted by glutamine (Gln) in the rest of genera. Both substitutions are conservative. The metal binding site Thr265 (blue arrow) is also conserved except again in *Bacillus* and *Clostridium* substituted by valine (Val).

The structure–function relationship of bacteria levansucrases have been accurately described in





**Figure 2.** Evolutionary branches of levan sucrases from 107 bacterial genera. The phylogenetic tree of the levansucrases enzymes from 107 bacterial genera genomes and the root was put at the mid-point of the longest span across the tree. The tree was inferred by FastTree from the alignments of levansucrases enzymes constructed by HMMER packages and edited on iTOL. Putative clades are numbered.

several excellent works (Meng and Fütterer 2003; Martinez-Fleites et al. 2005; Meng and Fütterer 2008; Öner et al. 2016) and our results extend, by the inclusion in the analysis G+, G− anaerobic and aerobic genera, those described previously. However, it must be pointed out that, in our work, we have found a higher degree of identity in many regions of the sequences which suggest the necessity of more experimental and taxonomic work to elucidate the role of all of them.

## Biomedical applications

Levan synthesis, production and catalysis are gaining importance due to its potential applications in biomedical engineering. In recent years, some works have

been published covering a wide range of applications such as carrier for drug delivery, film agent or prebiotic and many others. Hereinafter, the most promising uses are summarized and discussed in order to show an updated state-of-the-art of trends in levan practical usefulness.

### **Levan as an anti-inflammatory**

Liu et al. (2010) suggested that levan can have properties as anti-inflammatory substance. They measured cell viability by using MTT assay in splenocytes from BALB/c mice after treating with different amounts of an exopolysaccharide (EPS) obtained from *Bacillus licheniformis*. The results showed an improvement in splenocytes (a phagocytic cell from spleen)

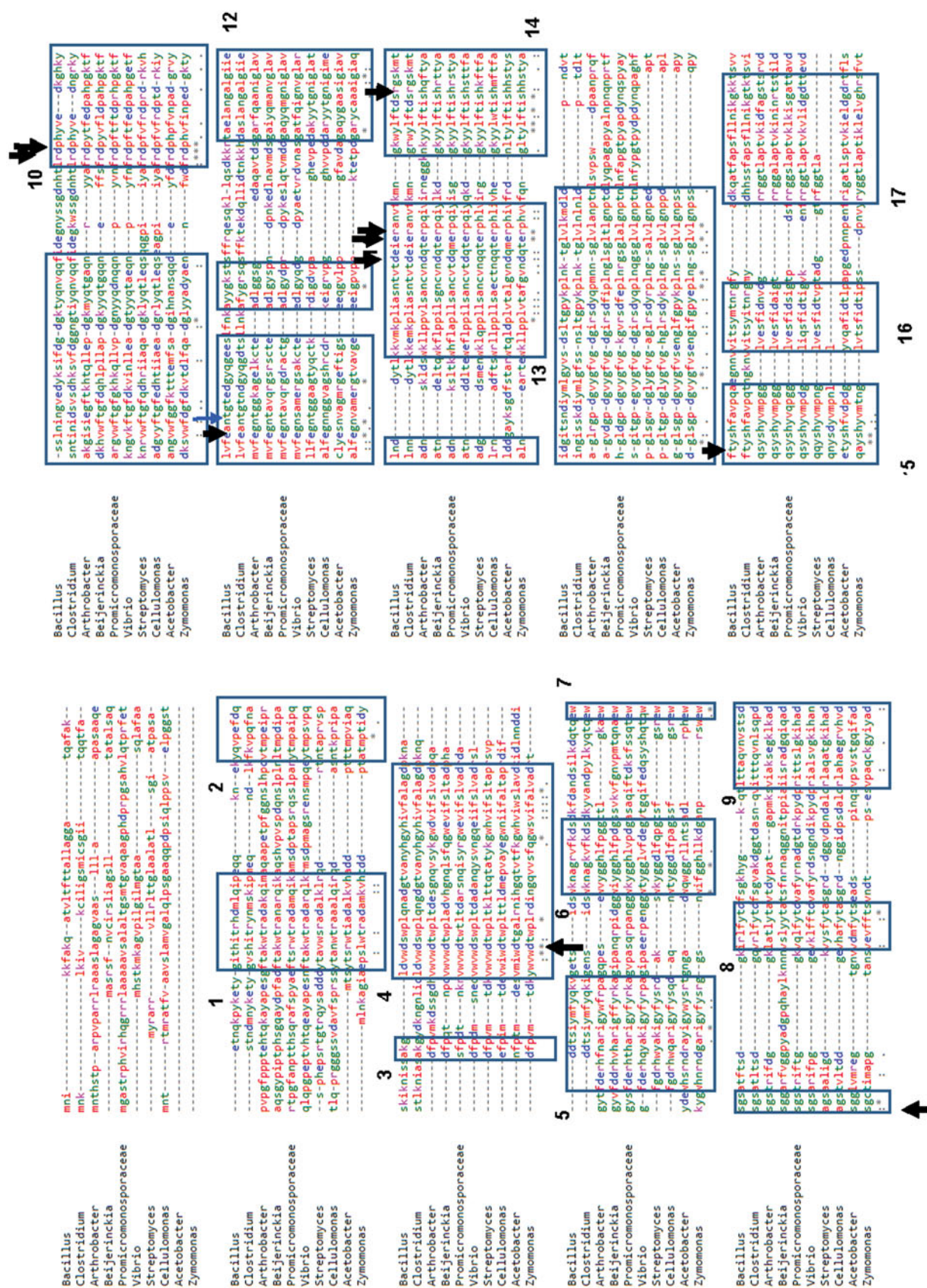


Figure 3. Multiple alignment of the region of similarity of levansucrases in Gram + and Gram – bacteria. The origin is always the first amino acid methionine. Asterisks indicate identity and dots indicate conservative changes. Regions with the highest identity are put in the box.



proliferation. However, a high amount of that EPS ( $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) is needed in order to achieve a result comparable with other well-recognized modulators (such as lipopolysaccharide from bacteria). It is not clear if that EPS is levan or a mixture of levan and other polysaccharides synthesized by *B. licheniformis*.

Recently, this question is gaining in relevance, and three works are published in 2015 and 2016 related with this topic. The work presented by Dong et al. (2015) solves the problem related with concentration with an appropriate purification and the obtention of levan from another micro-organism (*Curcuma kwangsiensis*). They showed an increment in cell proliferation has been gotten with a low concentration ( $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Moreover, they determined directly the effect on phagocytic activity, which was increased 40% respect to control one. Srikanth et al. (2015) also determined the anti-inflammatory effect of levan. They used BSA denaturation method for comparing levan with a well-known anti-inflammatory drug: diclofenac sodium. Results have shown that levan had an activity of 71% compared with that drug (100%). That effect suggests levan as a potential natural anti-inflammatory substance.

Moreover, the study published by Xu et al. (2016) with levan from *Paenibacillus bovis* described an improvement in spleen lymphocytes proliferation and identified the variation on cytokine production after levan addition. They concluded that the concentration of the Necrosis tumor factor ( $\text{TNF}\alpha$ ) has grown after the addition. That fact steps up its potential use as anti-inflammatory.

### Levan as an antitumour

In 1986, Leibovici et al. (1986) suggested that levan can act as an antitumor. Their experiments show that, in some cases, levan increases B cell activity, for tumour control. However, other experiments, depending on the doses, show contradictory effects. Therefore, it was unclear that possibility.

Several years later, in 2000, a more detailed approximation was done. Calazans et al. (2000) used levan from *Z. mobilis* for treating Sarcoma 180 cells. They used a wide range of levan molecular weights (MW) and measured the tumour weight. Results showed a significant variation according to MW, where the most activity was yielded by levan with a molecular weight about 400–500 kDa. The percentage of tumour inhibition varies from 25% to 75%. Moreover, Yoo et al. (2004) verified that fact in another cell lines (hepatic and gastric cancers), with a variation between 38% and 68%. At this point, it is identified the best

range for anti-tumour inhibition, between 600–800 kDa. Furthermore, Yoon et al. (2004) also studied the effect of levan-branching on anti-tumour activity in stomach and hepatic cancers. The main conclusion was: as more branching percentage, more inhibition of tumour growth by levan.

Recently, some studies have been published in order to focus on this idea. One research line explores the effect of chemical modifications in levan molecule. In this line, Abdel-Fattah et al. (2012) showed that sulphated levan reduced more than “native” levan in hepatic cell lines; and Liu et al. (2012) selected the phosphorylated one, as the best option for gastric cancer treatment.

Currently, research efforts are focus on describing which method is used by levan for inducing that inhibition on tumour growth (Abdel-Fattah et al. 2012; Sarilmiser and Oner 2014). At this point, it is clear that is mediated by apoptosis. However, it is not clear which caspases are involved in the process (caspases 3 and 7, or caspases 3 and 9). In any case, there are results enough to conclude that levan is a suitable polysaccharide for antitumor treatment.

### Effect of levan in cell proliferation?

Despite that levan have some physical and chemical properties that make it attractive for forming scaffolds, only few works has presented that possibility. At this point, it is important to remark, the paper published by Erginer et al. (2016). They suggested sulphated-levan (from *Halomonas*) as biocompatible material for cardiac tissue engineering due to its anticoagulant activity (similar to heparin). However, there are not studies focusing on how to build that scaffolds or an *in vitro/in vivo* evaluation.

### Levan as prebiotic

Yang et al. (2015a, 2015b) have studied the possible use of levan as prebiotic. Prebiotics are substances that stimulate the growth of different bacteria populations in animal gut-colon. They concluded that levan could avoid the adhesion of the enterotoxigenic *E. coli* to the mucosa (achieving best results in pig growth). Moreover, levan could modulate global bacteria population, as Adamberg et al. (2015) has presented. Levan enhanced the amount-growth of *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* and *Lactobacilli*. The first one has been identified recently as an interesting host in human gut, because of its anti-inflammatory properties. The last ones have been considered traditionally as the strains enhanced when prebiotics are fed. More studies

are needed at this point to focusing on levan as potential prebiotic.

### **Levan as an antioxidant**

Another property of levan, that has been identified, is its potential as antioxidant. Abdel-Fattah et al. (2012) showed its scavenging activity in HepG2 cells. They also proved that sulphated-levan offers better results than “native” levan. Esawy et al. (2013) also reported that scavenging activity and they specify the cause (glutathione-S-transferase is enhanced). Moreover, Dahech et al. (2013) show an interesting effect of levan. Levan increases the activity of catalase and superoxide dismutase (two enzymes involved in oxidative stress). Therefore, levan can be used as a protector for illness as atherosclerosis or hypercholesterolemia. That study reveals a decrease in the amount of total triglycerides in hypercholesterolemia-rats, when they are fed with levan.

### **Levan for producing drug delivery systems (DDS)**

DDS are usually constituted by a carrier (a polymer) and the drug that has to be released in a controlled way. Since the DDS has to be introduced in the human body the polymer must be biodegradable and biocompatible. In this aspect, many polymers have been used for DDS production, such as poly(lactic acid), poly(glycolic acid) or polycaprolactone (Martín del Valle et al. 2009). However, over these last years, polysaccharides have emerged as proper compounds for this regard due to their natural origin and their similarities with biological macromolecules avoiding as a consequence toxicity problems and undesirable reactions for the human. Chitosan or alginates are examples of polysaccharides that have already used for producing DDS for biomedical applications (Ulery et al. 2011).

Currently, levan is the major fructose polysaccharide that has been used for producing a DDS. A fructose polysaccharide can provide several advantages in comparison with polymers with pyranose rings. For instance, liver, breast and colorectal tumour cells over-expressed the GLUT5 transporter that can be targeted by fructose polymers (Kim et al. 2015). Moreover, levan is a polymer that can self-assemble in water into nanoparticles. That shows a great potential to be used as an encapsulating agent because an easy mixing process can be used for producing nanocapsules. As an example, Demir Sezer et al. (2015) loaded levan with vancomycin with an encapsulation efficiency ranging from 45% to 75% and with a particle size between

400 nm and 1.3  $\mu\text{m}$ . In this case, the Z-potential value was always between 4 and 6.5 mV. However, those values involve phenomena of aggregation that are not desirable. Demir Sezer et al. (2011) also used levan to encapsulate bovine serum albumin (BSA), obtaining particles between 200 and 540 nm and with an entrapment efficiency ranging from 50% to 70%. Again, the Z-potential values were around 4–7 mV. Finally, Kim et al. (2015) formed nanoparticles of levan and indocyanine green for breast cancer diagnosis by taking advantage of the abovementioned affinity between fructose and GLUT5. Particles around 150–200 nm were obtained, but with a poor encapsulation efficiency (14–30%) whereas no Z-potential values were determined. However, they showed with *in vivo* experiments (with mice) that these nanoparticles targeted breast cancer cells.

The low Z-potential values (proper values are around 15–30 in absolute value) of the previous articles indicate the particles tendency to form aggregates, what can hinder their use for different applications. That disadvantage may be overcome by modifying the polymer surface or by anchoring a drug with a negative charge that can be bound to the levan hydroxyl groups by electrostatic interactions. In this context, Tabernero et al. (2017) produced a DDS of levan with 5-fluorouracil by anchoring the drug to the polymer surface. They obtained a nanoparticle system of 300–400 nm of size with a Z-potential of  $-20$  mV because of the orientation of the fluoride atom. In addition, they performed stability studies with levan particles, highlighting that a basic pH is required to decrease the aggregation phenomenon.

Another fact concerning the preparation of a DDS is the levan surface engineering. That possibility has not been investigated at a great extent. Nevertheless, aldehyde groups were obtained by means of a reaction with periodate oxidation, what means that other functional groups can be incorporated to the polymer molecule, mainly due to the reaction with the polymer hydroxyl groups, as has been done with the fructose rings (Sarilmiser and Oner 2014). That fact can be useful for anchoring a drug to the aldehyde groups. In this context, the carboxymethylation of levan may be performed (as happened with other polymers such as cellulose) to produce the carboxymethyllevan to produce a subsequent binding process to the carboxylic groups (Tabernero et al. 2017).

Furthermore, levan shows a great potential as well for regenerative medicine. Its ability to promote cell proliferating, its film properties as well as healing



wounds make this polymer a promising material for creating scaffolds with cells incorporated.

Levan can be used as well as a coating or capping agent of different metals by taking advantage of the reduction power of the polysaccharide. Cerium oxide nanoparticles were coated with levan, showing the outcome an improved antioxidant activity. This formulation can be useful for treating reactive oxygen species (ROS) diseases (Kim et al. 2016).

Another work proposes the coating of particles of iron, selenium and cobalt with different techniques by using levan as a coating agent (Bondarenko et al. 2016). According to the results, nanoparticles (always with a size between 150 nm and 200 nm) of the different systems were obtained. Those nanoparticles had a polydispersity index of around 0.2–0.3 (indicating the particle sphericity), whereas only proper zeta-potential values were obtained for half of the experiments. Different experiments showed that those levan nanoparticles can improve the cellular metabolism. However, as the authors reported, more work has to be done regarding the effect of the nanoparticles degradation products on the colon (Bondarenko et al. 2016).

Levan can be used as well as a reducing agent to obtain different nanoparticles systems. As an example, gold and silver nanoparticles were produced by reducing the respective compounds ions (silver nitrate and gold chloride) into nanoparticles capped with levan (Ahmed et al. 2014). Nanoparticles catalytic activity was successfully tested for the reduction of different compounds.

### Levan as a film agent

Over these last years, sea is the main source for producing natural compounds (alginate through *Azotobacter vinelandii* and chitosan though marine crustacean, mainly) for producing adhesives and films for biomedical uses. Those materials show biocompatibility, non-toxicity and antimicrobial activities. In this context, although levan is obtained from a microbial source its properties are optimal for developing adhesives films or gels for medical applications.

Levan was blended with glycerol and then was thermally processed and extruded to create a film. Authors reported that a 20% weight of glycerol is needed to achieve an efficient plasticization and to reduce the glass temperature. The only drawback is that a hot extrusion is not a convenient process for

using the films for biological purposes (Barone and Medunets 2007).

Another levan film was created by using montmorillonite. In this case, the montmorillonite surface oxygens were bonded to the levan hydroxyl groups, conferring a thermal stability to the polymer and an increase in the glass transition temperature depending on the montmorillonite composition (1% of montmorillonite increases 33 °C the glass transition temperature). Young's modulus is also improved with the mineral composition, providing up to a 480% increase in comparison with the original levan polymer (Chen et al. 2014).

Levan ability to promote cell growth has been exploited in levan films. Levan was phosphonated and a film was created by mixing the polymer with chitosan by using a layer-by-layer process and by electrostatic interactions (Costa et al. 2013). In this case, the zeta-potential of the film gets a negative value (around −13 mV) due to the phosphonation process. The mechanical properties of the levan film were compared with an alginate–chitosan film, showing the levan film a better resistance to the detachment. Moreover, cell adhesion was performed with a L929 cell line, obtaining a better cell adhesion with the levan film (110 cells·mm<sup>−2</sup>) in comparison with alginate film (20 cells/mm<sup>2</sup>). This work is very promising concerning the use of a levan-based polymer for producing films for tissue and/or regenerative engineering (Costa et al. 2013).

On the contrary, levan gelation possibility has not been extensively examined up to now. However, two articles have recently been published concerning this issue. The first one is based on the *B. subtilis* (a levan producing bacteria) biofilm. The authors reported that DNA plays an important role in the levan gelling behaviour and can confer a compact gel structure to the polymer (Benigar et al. 2016). That work highlights a possible future work regarding the preparation of a drug delivery system composed of a levan gel with DNA with a drug entrapped within the gel. The second one (Osman et al. 2017) has reported a thermosensitive gel constituted by levan and pNIPAA so as to 5-ASA release.

### Concluding remarks and future

Levan polymer shows remarkable characteristics in many aspects being the most promising its utilization as biomaterial and in medical, pharmaceutical and nanotechnological industries. To increase our knowledge about levan, we have to increase the number of bacterial genera and species studied and to determine

which organisms are going to serve as models. We also need to obtain more data about the secretory mechanism involved in the process, a better and deeper knowledge of the promoter regulation of the levansucrase genes. Finally, the production processes must be improved and the utilization of recombinant micro-organisms in levan production, mainly *E. coli* or other bacteria and yeast with GRAS status (must be carefully considered).

## Disclosure statement

The authors report no declarations of interest.

## Funding

Authors want to acknowledge Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding support (Project code: CTQ2016-78988-R). Álvaro González-Garcinuño also acknowledges his PhD grant (F. P. U.) from the Ministry of Education, Culture and Sports, Spain (Ref. FPU14/04914).

## References

- Abdel-Fattah AF, Mahmoud DA, Esawy MA. 2005. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and Fructo-Oligosaccharides. *Curr Microbiol* 51:402–407.
- Abdel-Fattah AM, Gamal-Eldeen AM, Helmy WA, Esawy MA. 2012. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydr Polym* 89:314–322.
- Adamberg K, Tomson K, Talve T, Pudova K, Puurand M, Visnapuu T, Alamäe T, Adamberg S. 2015. Levan enhances associated growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in Fecal Microbiota. *PLoS One* 10:e0144042.
- Ahmed KBA, Kalla D, Uppuluri KB, Anbazhagan V. 2014. Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydr Polym* 112:539–545.
- Alamäe T, Visnapuu T, Mardo K, Mäe A, Zamfir D. 2012. Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans. In: Rauter AP, Lindhorst, TK, editors. *Carbohydrate chemistry, specialist periodical reports*, Vol. 38. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 176–191.
- Arrieta JG, Sotolongo M, Menéndez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramírez R, Hernández L. 2004. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* 186:5031–5039.
- Barone JR, Medunets M. 2007. Thermally processed levan polymers. *Carbohydr Polym* 69:554–561.
- Benigar E, Valant AZ, Dogsa I, Sretenovic S, Stopar D, Jamnik A, Tomsic M. 2016. Structure and dynamics of a model polymer mixture mimicking a levan-based bacterial biofilm of *Bacillus subtilis*. *Langmuir* 32:8182–8194.
- Bondarenko OM, Ivask A, Kahru A, Vija H, Titma T, Visnapuu M, Joost U, Pudova K, Adamberg S, Visnapuu T, Alamäe T. 2016. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydr Polym* 136:710–720.
- Calazans GMT, Lima RC, de França FP, Lopes CE. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int J Biol Macromol* 27:245–247.
- Chen X, Gao H, Ploehn HJ. 2014. Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydr Polym* 101:565–573.
- Costa RR, Neto AI, Calgeris I, Correia CR, Pinho ACM, Fonseca J, Öner ET, Mano JF. 2013. Adhesive nanostructured multi-layer films using a bacterial exopolysaccharide for biomedical applications. *J Mat Chem B* 1:2367–2374.
- Crutz AM, Steinmetz M, Aymerich R, Le Coq SR. 1990. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Bacteriol* 172:1043–1050.
- Cuskin F, Flint JE, Gloster TM, Morland C, Baslé A, Henrissat B, Coutinho PM, Strazzulli A, Solovyova AS, Davies GJ, Gilbert HJ. 2012. How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20889–20894.
- Dahech I, Harrabi B, Hamden K, Feki A, Mejdoub H, Belghith H, Belghith KS. 2013. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *Int J Biol Macromol* 58:281–286.
- Demir Sezer A, Kazak H, Öner ET, Akbuga J. 2011. Levan-based nanocarrier for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydr Polym* 84:358–363.
- Demir Sezer A, Sarilmiser K, Rayaman E, Cevikbas A, Öner ET, Akbuga J. 2015. Development and characterization of vancomycin-loaded levan based microparticulate system for drug delivery. *Pharm Dev Technol* 25:1–8.
- Dong CX, Zhang LJ, Xu R, Zhang G, Zhou YB, Han XQ, Zhang Y, Sun YX. 2015. Structural characterization and immunostimulating activity of a levan-type fructan from *\*Curcuma kwangsiensis*. *Int J Biol Macromol* 77:99–104.
- Erginer M, Akcay A, Coskuncan B, Morova T, Rende D, Bucak S, Baysal N, Ozisik R, Eroglu MS, Agirbasly M, Oner ET. 2016. Sulfated levan from *Halomonas smyrnensis* as a bioactive, heparin-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications. *Carbohydr Polym* 149:289–296.
- Esawy MA, Amer H, Gamal-Eldeen AM, Enshasy HA, Helmy WA, Abo-Zeid MAM, Malek R, Ahmed EF, Awad GEA. 2013. Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydr Polym* 95:578–587.
- Eun-Kyung J, Jang KH, Koh I, Kim IH, Kim SH, Kang SAH, Kim CH, Ha SD, Rhee SK. 2002. Molecular characterization of the Levansucrase Gene from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 and its expression in *Escherichia coli*. *Microbiol Biotechnol* 12:603–609.

- Franken J, Brandt BA, Tai SL, Bauer FF. 2013. Biosynthesis of levan, a bacterial extracellular polysaccharide, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 8:e77499. doi:10.1371/journal.pone.0077499
- Han WC, Byun SH, Kim MH, Sohn EH, Lim JD, Um BH, Kim CH, Kang SA, Jang KH. 2009. Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*. J Microbiol Biotechnol 19:1153–1160.
- Han YW. 1990. Microbial levan. Adv Appl Microbiol 35:171–194.
- Kim SJ, Baem PK, Chung BH. 2015. Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. Chem Commun (Camb.) 51:107–110.
- Kim SJ, Chung BY. 2016. Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. Carbohydr Polym 150:400–407.
- Korneli C, Biedendieck R, David F, Jahn D, Wittmann C. 2013. High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium*. Appl Microbiol Biotechnol 97:3343–3353.
- Leibovici J, Kopel S, Siegal A, Gal-Mor O. 1986. Effect of tumor inhibitory and stimulatory doses of levan, alone and in combination with cyclophosphamide, on spleen and lymph nodes. Int J Immunopharmacol 8:391–403.
- Letunic I, Bork P. 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics 23:127–128.
- Li W, Yu S, Zhang T, Jiang B, Mu W. 2015. Recent novel applications of levansucrases. Appl Microbiol Biotechnol 99:6959–6969.
- Liu C, Lu J, Lu L, Liu Y, Wang F, Xiao M. 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. Bioresour Technol 101:5528–5533.
- Liu J, Luo J, Ye H, Zeng X. 2012. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Food Chem Toxicol 50:767–772.
- Martín del Valle EM, Galán MA, Carbonell R. 2009. Drug delivery technologies: the way forward in the new decade. Ind Eng Chem Res 48:2475–2486.
- Martínez-Fleites C, Ortiz-Lombardía M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, \*L. Hernández GJ. 2005. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Biochem J 390:19–27.
- Menéndez C, Banguela A, Caballero-Mellado J, Hernández L. 2009. Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Appl Environ Microbiol 75:1782–1785.
- Meng G, Fütterer K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrases. Nat Struct Biol 10:935–941.
- Meng G, Fütterer K. 2008. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrases. BMC Struct Biol 8:16–27.
- Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Remaud-Siméon M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int Dairy J 11:675–685.
- Naumoff DG. 1999. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional beta-xylosidases and alpha-l-arabinases. FEBS Lett 448:177–179.
- Öner ET, Hernández L, Combie J. 2016. Review of Levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. Biotechnol Adv 34:827–844.
- Osman A, Oner ET, Eroglu MS. 2017. Novel levan and pNIPAA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release. Carbohydr Polym 165:61–70.
- Park NH, Choi HJ, Oh DK. 2005. Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity. Biotechnol Lett 27:495–497.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. Mol Biol Evol 26:1641–1650.
- Sarilmiser HK, Oner ET. 2014. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6t. Biochem Eng J 92:28–34.
- Seek Parka B, Vladimira A, Kima CH, Rheea SK, Kanga HA. 2004. Secretory production of *Zymomonas mobilis* levansucrase by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Enzyme Microb Technol 34:132–138.
- Shih IL, Chen LD, Wu JY. 2010. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. Carbohydr Polym 82:111–117.
- Srikanth R, Siddhartha G, Reddy CHSSS, Ramaiah HBSMJ, Uppuluri KB. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. Carbohydr Polym 123:8–16.
- Strube CP, Homann A, Gamer M, Jahn D, Seibel JD, Heinz DW. 2011. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. J Biol Chem 286:17593–17600.
- Taberner A, González-Garcinuño A, Sánchez-Álvarez JM, Galán MA, Martín del Valle EM. 2017. Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: stability and drug release studies. Carbohydr Polym 160:26–33.
- Trujillo LE, Arrieta JG, Dafnisa F, Garcia J, Valdes J, Tambarac Y, Perez M, Hernandez L. 2001. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Enzyme Microb Technol 28:139–144.
- Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. 2011. Biomedical applications of biodegradable polymers. J Polym Sci B Polym Phys 49:832–864.
- Ullrich M. 2009. Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. Norfolk (UK): Horizon Scientific Press.
- Wuerges J, Caputi L, Cianci M, Boivin S, Meijers R, Benin S. 2015. The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. J Struct Biol 191:290–298.
- Xu X, Gao C, Liu Z, Wu J, Han J, Yan M, Wu Z. 2016. Characterization of the levan produced by *Paenibacillus bovis* sp. nov. BD3526 and its immunological activity. Carbohydr Polym 144:178–186.
- Yang Y, Galle S, Le MHA, Zijlstra RT, Gänzle MG. 2015. Feed fermentation with reuteran and levan-producing *Lactobacillus reuteri* reduces Colonization of Weanling Pigs

- by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 81:5743–5752.
- Yang Y, Zhao X, Le MHA, Zijlstra RT, Gänzle MG. 2015. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. Front Microbiol 6:762.
- Yoo SH, Yoon EJ, Cha J, Lee HG. 2004. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. Int J Biol Macromol 34:37–41.
- Yoon EJ, Yoo SH, Cha J, Lee HG. 2004. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. Int J Biol Macromol 34:191–194.

RESEARCH

Open Access



# Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight

Álvaro González-Garcinuño, Antonio Tabernero, José M<sup>a</sup> Sánchez-Álvarez, Miguel A. Galán and Eva M. Martín del Valle\*

## Abstract

**Background:** Levan has been traditionally produced from microorganism. However, there is a continuous effort in looking for new strains that improve levan production yield and uses alternative sugar sources for growth. Despite having a wide range of data about levan yield, there are not papers which allow controlling molecular weight, and that plays an essential role for further applications.

**Results:** The effect of the sucrose concentration on levan yield (and its molecular weight) from *Bacillus atrophaeus* and *Acinetobacter nectaris* (Gram positive and Gram negative respectively) was studied in this work. It was found that *A. nectaris* growth (from 3 to 1.5 g L<sup>-1</sup> in 40 h) and its levan production (from 3 to 1.5 g L<sup>-1</sup>) decreases by increasing sucrose concentration (best results at a concentration of 120 g L<sup>-1</sup>) whereas *B. atrophaeus* growth (3.5 g L<sup>-1</sup> in 30 h) and its levan production (also 3.5 g L<sup>-1</sup>) were not affected by modifying that parameter. Levan molecular weight from *A. nectaris* decreases by increasing sucrose concentration (from 8000 to 2000 kDa) whereas levan molecular weight from *B. Atrophaeus* remains always around 50 kDa. By performing a kinetic study, it was shown that *A. nectaris* growth follows a substrate-inhibition model, whereas Monod equation provided a good fit for *B. atrophaeus* growth. Finally, wastes from orange juice industry were used as a medium culture to cultivate those microorganism, obtaining good results with *B. atrophaeus* (growth 3 g L<sup>-1</sup> in 30 h).

**Conclusions:** Levan production kinetics was determined and compared between different bacteria types.

**Keywords:** Levan, Molecular weight, Kinetics, Byproducts

## Background

Levan is a homopolysaccharide of fructose units which is produced by some plants and microorganisms. These organisms have an enzyme called levansucrase (EC.2.4.1.10), which breaks the sucrose bond between glucose and fructose, and after that, polymerizes these fructoses linked  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6). Levan is considered as an exopolysaccharide (EPS), because it is synthesized outwardly the cell. Levansucrase is translated from its respective mRNA in cell cytosol and is secreted to

bacterial peptidoglycan wall at acid pH (5–6) where it catalyzes the reaction described above [1].

Levan is a non-typical biopolymer because it is formed by furanoses units (fructose), whereas other biopolymers are formed by pyranoses residues. This fact could have an incredibly interest for different applications such as industry, cosmetics, medicine or nanotechnology [2].

Levan has been traditionally obtained from microorganisms. *Zymomonas mobilis*, a Gram negative bacterium, is considered the most common microorganism for that matter. However, *Z. mobilis* produces ethanol at the same time, so a subsequent step is needed for levan purification. The other well-known bacterium for levan production is *Bacillus subtilis*, which has been extensively studied. Recently, new genera like *Hallomonas* or

\*Correspondence: emvalle@usal.es  
Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plza. Los  
Caidos s/n, 37007 Salamanca, Spain

*Pseudomonas* have been used for levan production [3, 4]. In total, more than 50 studies have been performed with the aim of analyzing bacteria for levan production [1].

Those studies were focused on optimizing the medium culture in terms of pH, temperature, use of substrates, etc. As an example, Silbir et al. [5] used *Z. mobilis* strain B-14023 for levan production. These authors presented yeast extract as the most promising nitrogen source for levan production. Another example is the study published by Ing-Lung et al. [6], where temperature, culture time and pH are considered for levan production with *B. subtilis* (natto). Ing-Lun et al. [7] also studied the effect of sucrose concentration on levan production, obtaining the best results between 200 and 300 g L<sup>-1</sup>. However, none of these articles took into account the effect of the different medium culture in the polymer properties, such as molecular weight.

Nonetheless, there is not a study that explains the role of the bacteria type in levan production (e.g. differences between Gram negative and Gram positive bacteria) and although there are some articles reporting the kinetics of the levan production [8], to the best of our knowledge those kinetics have not been mathematically modelled and as a consequence they have not been fully investigated.

In addition, some studies such as Nicholson et al. [9] reported an important link-up between molecular weights and some polymer properties like melt viscosity, tensile strength, resistance to heat and corrosion properties. These properties could be really interesting for the applications described above such as biomedicine or food. As an example, levan antitumour activity depends on the molecular weight, obtaining a maximum antitumour inhibition for a viscosity molecular weight around 210,000 kDa [10]. Moreover, Elvassore et al. [11] suggested that higher PEG-PLA molecular weight of polymer PEG-PLA, produces a worse drug encapsulation efficiency as well as affecting the drug release. Specifically, a low polymer molecular weight involves a slow and constant drug release.

Furthermore, it is essential to investigate new trends for levan production in order to reduce costs. One of the possible options is the use of cheaper sources as alternative substrates. As an example, Roberto de Oliveira et al. [12] used some regional residuals (sugar cane syrups and sugar cane molasses) as a carbohydrate sources up to a sucrose concentration of 250 g L<sup>-1</sup> to produce levan. However, wastes from fruit industry (that can be a proper alternative) have not been used yet as an alternative to protein sources (such as yeast extract).

Based on the above-mentioned facts, the main aims of this article are to study the effect of the different type of bacteria and the sucrose concentration on levan

production and its molecular weight as well as modelling the kinetics involved in this biopolymer production process. Besides, a new substrate source (a food industry waste) is tested as an alternative culture medium.

In order to do that, two new strains (*Bacillus atrophaeus* and *Acinetobacter nectaris*), which have not been used before for levan production, were selected for this study. One of them is a Gram positive bacteria and the other is a Gram negative. Therefore, by using new experimental data and by performing a comparison of our results with some results from literature, the effect of the bacteria type on the polymer molecular weight may be explained. These strains were, in addition, selected in order to find new strains for producing levan as well as for identifying if an original Spanish isolated bacterium (*A. nectaris*) can be used for that purpose.

Moreover, the effect of the sucrose concentration in levan yield and its molecular weight was studied by modifying the amount of sucrose in the culture medium. Growth and levan yield results were in addition mathematically modelled in order to define the kinetics type followed by the studied bacteria. Finally, wastes from the orange juice industry were tested as an alternative source of proteins for producing levan, indicating the possibility of using food industry residuals to grow microorganisms for biopolymer production.

## Methods

### Microorganisms and culture medium

Two bacteria strains were selected from Spanish microorganism collection culture (CECT). Specifically, *B. atrophaeus* (CECT 0038) as a Gram negative bacteria and *A. nectaris* (CECT 8127) as a Gram positive bacterium. The last one was isolated from nectar in wild Mediterranean insect-pollinated plants at Doñana Park in Huelva (Spain).

Both strains were cultured in flask recipients (volume 250 mL), using the following culture media: 7 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 2.5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.6 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>. After that, the pH was adjusted between 5.5 and 6 (with HCl 1 M). Experiments were carried out at 30 °C and a stirring speed 150 rpm [6].

Furthermore, in order to reduce the medium cost, a byproduct from the juice industry (juice pulp after oranges squeezing process) was used to cultivate the previous microorganisms. That pulp was heated at 90 °C in water in order to extract nutrients from it, and after that, that liquid was filtered to remove the remaining solids. A source of inorganic nitrogen (ammonium nitrate at 1 g L<sup>-1</sup>) and sucrose (120 g L<sup>-1</sup>) were added to that liquid in order to achieve all the required nutrients.

Since the composition of the juice pulp is unknown, that waste was previously analyzed by elemental



microanalysis in order to know its chemical composition in carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulfur. This analysis procedure is given in “[Levan molecular weight determination](#)”.

#### Biomass determination and levan production

Biomass could be determined by following the solids in suspension method proposed by Xin et al. [13]. This spectrophotometric technique consists of measuring the absorbance of the biomass at 650 nm. In this context, the following equations were obtained to calculate the biomass for both strains (Eqs. 1, 2):

$$\text{For } A. nectaris: y = 0.1091x - 0.0216 \quad (1)$$

$$\text{For } B. atrophaeus: y = 0.1049x - 0.0089 \quad (2)$$

where  $y$  is the absorbance at 650 nm, and  $x$  is biomass concentration expressed in mg/mL.

Using these equations, biomass was measured each 8 h in order to control cell density and microorganism growth.

At the same time, levan could be estimated by the spectrophotometric method proposed by Vigants et al. [14] at 400 nm. This technique takes advantage of the change of turbidity (at 25 °C) in the culture medium due to the levan formation. The procedure is based on the extraction of an aliquot from the flask (each 8 h) that must be centrifuged at 10,000 rpm during 10 min to eliminate biomass. After that, the absorbance was measured at 400 nm. As a result, an equation (Eq. 3) was obtained to determine the levan concentration in our culture medium:

$$y = 0.1645x - 0.035 \quad (3)$$

where  $y$  is the absorbance at 400 nm, and  $x$  is levan concentration expressed in mg/mL.

Furthermore, the amount of glucose consumed for levan synthesis could be estimated using the Eq. 4 [15].

$$M_{\text{glucose}} = (180/162) \cdot M_{\text{levan}} \quad (4)$$

#### Biomass recovery and levan isolation

When the culture reaches its stationary phase, biomass is collected and extracted from the medium culture by centrifugation at 10,000 rpm during 10 min. This biomass is discarded, since the levan will be secreted in the supernatant phase. With the aim of extracting and isolating the biopolymer, the following process will be used:

Firstly, pH was adjusted between 9.5 and 10.5 with KOH 0.1 M in order to stop the enzymatic reaction for levan production. After that, 1 mL  $\text{CaCl}_2$  (1% w/w) was added each 20 mL of supernatant [4], following by the addition of ethanol 96% (v/v) in proportion ethanol:

supernatant 3:1. Finally, the resulting mixture is frozen at  $-20$  °C. After 25 h, the levan precipitates and by a centrifugation process (6000 rpm during 10 min) the polymer is isolated.

After that, a dialysis process was performed to purify the polymer. Basically, levan was dissolved in deionized water and the dissolution was dialyzed against ultrapure water (ultrapure water was changed two times after 24 h) by using cellulose membranes (Orange Scientific, Belgium) with porous size (12–14 kDa). This porous size was chosen with the aim of removing low molecular weight substances such as proteins, nucleic acids or other organic compounds that could be presented in culture media.

The solution was collected after dialysis, and was lyophilized by Telstar Lyophilizaer at  $-55$  °C and 0.020 bar in order to remove water and obtain the polymer as a solid product.

#### Polymer structure determination

Infrared spectrum (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) were carried out in order to determine the nature of the polymer extracted from culture broth.

FT-IR spectra were recorded in a Perkin-Elmer Spectra ONE instrument, using KBr pellets; 32 spectra (recorded with a nominal resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ ) were averaged to improve the signal-to-noise ratio.

Nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a 200 and 400 MHz (1H) and 50 and 100 MHz (13C) spectrometers by using a Varian Mercury 200 MHz. FTIR spectra were recorded as films. HRMS spectra were recorded by using Q-TOF using electrospray ionization.

#### Elemental microanalysis of biomass and orange wastes

In order to define the elemental composition of some substances (biomass or juice byproducts), the analysis of those products was performed by using a modified method from Pregl and Dumas (dynamic flash combustion). This method establishes a relative proportion for Carbon, Hydrogen, Nitrogen and Sulfur; determining Oxygen by difference.

Samples are encapsulated into a tin or silver vial and oxygen is injected into the vial. After that, the vial is placed in an oven at high temperature to produce combustion. Products from this combustion are:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$  and  $\text{SO}_x$ . These gases are transported along a pipe using Helium as carrier gas, finishing into an oxidation-reduction pipe. Finally, gases flow through a non-dispersive infrared detector with the aim of determining  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  and  $\text{SO}_2$  concentration.  $\text{N}_2$  is measured by thermal conductivity.

### Levan molecular weight determination

Molecular weight was determined by static light scattering (SLS) with Zsizer Nano (Malvern instruments). This method is a non-invasive technique that can be used to characterize molecules in a solution. Particles in the sample are illuminated by a light source such as laser, with the particles scattering the light in all directions. MW is determined by measuring the sample at different concentrations and applying the Raleigh equation (Eq. 5), which describes the intensity of light scattered from a particle in solution.

$$\frac{K \cdot C}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) P_\theta \quad (5)$$

where K is an optical constant which depends on laser wavelength, solvent refractive index and the differential refractive index increment.  $R_\theta$  is the Raleigh ratio and  $P_\theta$  is the angular dependence of the sample scattering intensity.  $M_w$  is molecular weight for the sample.  $A_2$  is the second virial coefficient; and C is the concentration. To determine the second virial coefficient and the molecular weight, samples with different polymer concentrations were analyzed by SLS. MW was determined as the interception of Y-axis whereas the slope is related with 2nd virial coefficient.

It is important to specify that this technique needs a standard compound with a well-known behavior in terms of SLS molecular weight determination. In this context, toluene was chosen because it is the most used compound for this purpose.

### Growth kinetics equation determination

Kinetics for microbial growth could be estimated using an unstructured kinetic model, where the specific growth rate ( $\mu$ ) is determined by using the differential Eq. 6.

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \quad (6)$$

where  $dx/dt$  is the biomass increment with time, x is biomass concentration at each time, and  $\mu$  is the specific growth rate.

In this case, D (dilution rate) is considered null because the experiments were performed at batch scale.

Furthermore, biomass results were adjusted to models based on Monod Model [16]. Product rate is calculated following the Eq. 7.

$$R_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} \quad (7)$$

where  $R_p$  is product rate, x biomass density, and  $dp/dt$ , the variation in product concentration with the time.

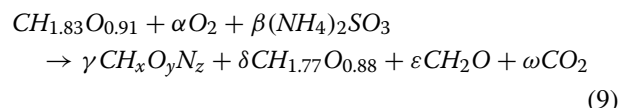
Moreover, it was studied if levan production could be adjusted to Luedeking–Piret model [17] (product

formation is associated to microbial growth). Luedeking–Piret model is described in Eq. 8.

$$R_p = \beta_{xp} \cdot \mu + m_p \quad (8)$$

where  $\beta_{xp}$  relates product with biomass,  $m_p$  is the maintenance coefficient (or ATP coefficient),  $R_p$  is product rate and  $\mu$  is the specific growth rate

On the other hand, stoichiometric coefficients were determined in order to complete the reaction general equation (Eq. 9):



this reaction corresponds to:

Sucrose + oxygen + ammonium sulfate  $\rightarrow$  biomass + levan + (glucose + fructose) + carbon dioxide

It is assumed that yeast extract is only used for essential amino acids uptake, and it has no contribution in mass balance.

## Results

Results are organized in the following way. Firstly, “[Influence of substrate concentration in biomass growth and its kinetic study](#)” and “[Influence of substrate concentration in levan production and its kinetic study](#)” describe the effect of the substrate concentration in biomass growth and levan production. The kinetic study is also included in each respective section.

Levan characterization is explained in “[Levan characterization](#)”, whereas the effect of the sucrose concentration on the molecular weight is studied in “[Influence of substrate concentration in levan molecular weight for both strains](#)”. On the other hand, experimental and kinetics studies of how glucose inhibits the levan yield are performed in “[Levan inhibition with glucose](#)”. Finally, the use of a waste product as a medium culture for producing levan is proposed in “[Wastes from juice factories as a substrate for cultivating both strains](#)”.

### Influence of substrate concentration in biomass growth and its kinetic study

Different concentrations of sucrose were added to the microorganism culture medium. Specifically, experiments were carried out with 120, 150, 180, 210, 240 and 270 g L<sup>-1</sup> sucrose for both strains. Those concentrations have been used previously in different articles [7, 12]. Biomass and levan were determined each 8 h following the methods already described in the experimental section. The pH remained between 5.5 and 6 because an acid medium is needed to secrete the levansucrase to the bacterial cell wall.



Growth results are shown at Fig. 1. Graph A belongs to biomass growth for *A. nectaris* and Graph B belongs to *B. atrophaeus* results.

As can be observed in Fig. 1a (for *A. nectaris*), biomass proliferation decreased with the sucrose (from 3.0 with 120 g L<sup>-1</sup> of sucrose to 2.0 g L<sup>-1</sup> with more than 180 g L<sup>-1</sup> of sucrose). However, for *B. atrophaeus*, the sucrose did not produce a significant effect on the microorganism growth (Fig. 1b) and the biomass growth ranged from 3.0 to 4.0 g L<sup>-1</sup>. It can be concluded that the best sucrose concentration was around 120 g L<sup>-1</sup> for *A. nectaris* (biomass growth around 3 g L<sup>-1</sup> in 30 h) whereas the optimum value was around 180 g L<sup>-1</sup> for *B. atrophaeus* (biomass growth around 4 g L<sup>-1</sup> in 30 h).

After determining biomass proliferation, the microorganism growth kinetics was studied. As was described before, *A. nectaris* may follow a typical substrate-inhibition kinetic (Eq. 10 [18]).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{\frac{S^2}{K_i} + S + K_s} \quad (10)$$

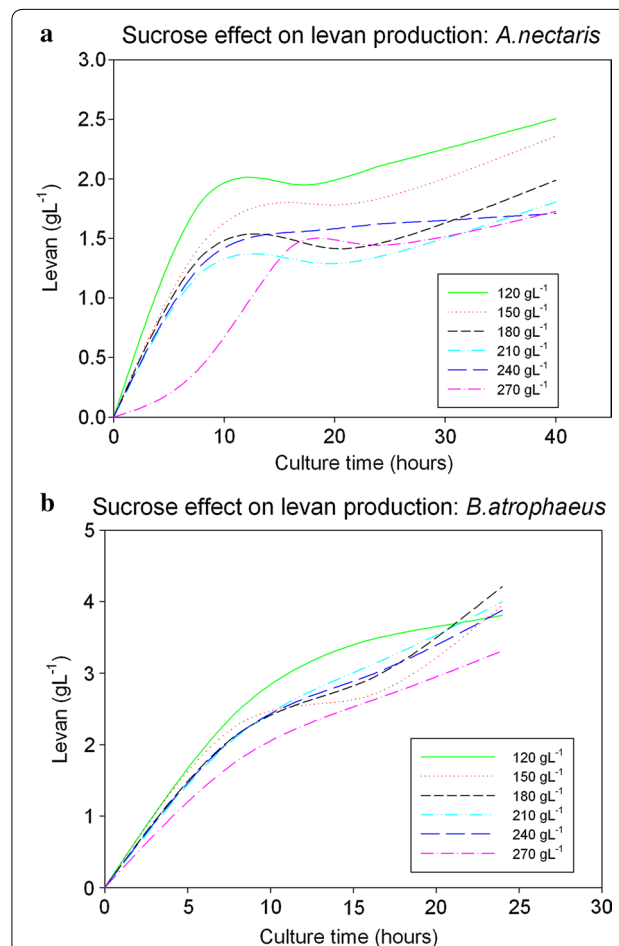
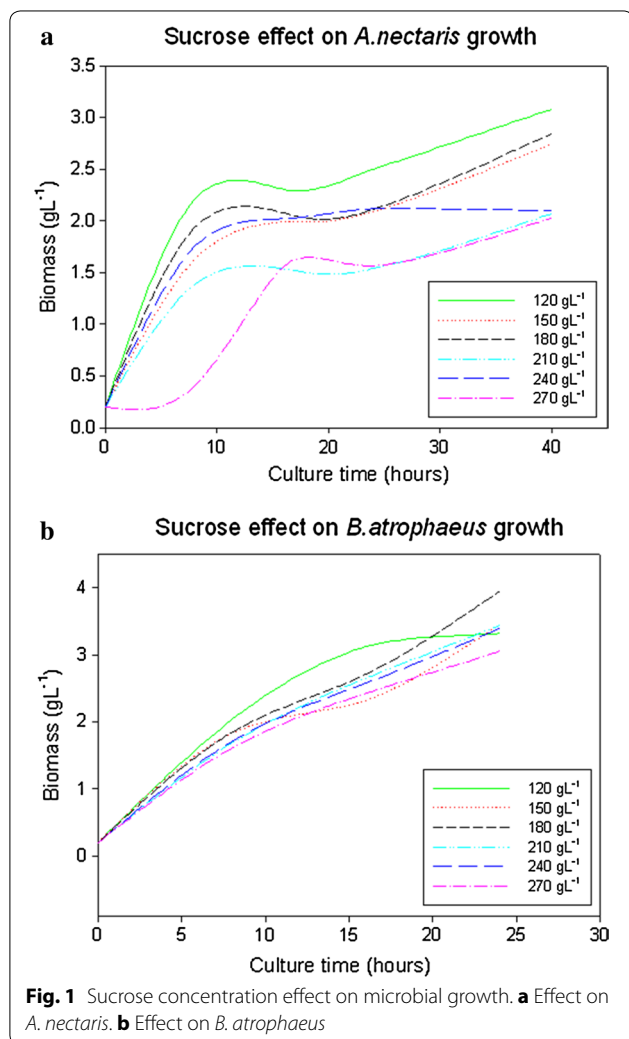
The following kinetic coefficients were obtained by fitting experimental data-theoretical data:  $\mu_{\max}$ : 3.207 h<sup>-1</sup>, K<sub>s</sub>: 2068 g L<sup>-1</sup>, K<sub>i</sub>: 9.73 g L<sup>-1</sup>.

The classical Monod model was used for fitting the experimental data with *B. atrophaeus* (without sucrose inhibition). A good correlation coefficient ( $R^2 > 0.90$ ) was obtained, whereas the kinetic parameters are:  $\mu_{\max}$ : 0.107 h<sup>-1</sup>, K<sub>s</sub>: 5.48 g L<sup>-1</sup>.

### Influence of substrate concentration in levan production and its kinetic study

While cultivating both bacteria, the levan produced was determined each 8 h, using the spectrophotometric method described above. Results for both strains are illustrated in Fig. 2.

Levan production and biomass proliferation follow the same tendency. Levan production from *A. nectaris*



decreases by increasing sucrose concentration (from 2.5 at 120 g L<sup>-1</sup> of sucrose to 1.5 with 270 g L<sup>-1</sup> of sucrose). On the other hand, there was not a clear effect of sucrose concentration on *B. atrophaeus* levan yield (between 3.0 and 4.0 g L<sup>-1</sup> for all sucrose concentrations in the medium). That is, sucrose concentration inhibited levan production in Gram negative bacteria, but it had no effect on Gram positive bacteria.

Assuming that levansucrase follows the well-known Michaelis–Menten kinetic equation [19]; parameters *V*<sub>max</sub> and *K*<sub>m</sub> were determined for both strains by fitting experimental to theoretical data. For *A. nectaris*, *V*<sub>max</sub> and *K*<sub>m</sub> values are: 0.061 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, and 66 g L<sup>-1</sup>, respectively. For *B. atrophaeus*, *V*<sub>max</sub> and *K*<sub>m</sub> values are: 0.109 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 54 g L<sup>-1</sup>. These results agreed with the inhibition hypothesis for Gram negative strains. *B. atrophaeus* can produce levan two times faster than *A. nectaris*, and substrate specificity was higher for *B. atrophaeus* than for *A. nectaris* (the lowest *K*<sub>m</sub> was obtained for *B. atrophaeus*).

With the previous results, it is possible to analyze if levan production is associated with biomass growth. This fact, which has not been studied previously in the literature, must be taken into account for a scale-up. Firstly, it was assumed that levan is associated with biomass proliferation, following Luedeking–Piret equation (Eq. 8).

Luedeking–Piret equation was used for fitting the experimental data for each sucrose concentration for both strains, obtaining the following parameters (Table 1)

Finally, in order to complete the reaction general equations, stoichiometric coefficients were determined as it was explained in kinetics section. For performing mass balances calculation, two initial conditions were determined experimentally:  $\beta x_p$  that can be calculated as  $\delta/\gamma$ , that can be calculated from Vigants experiments—Eq. (4). In our case,  $\delta = 0.562$  Cmol levan/Cmol sucrose, whereas  $\beta x_p$  is taken for each strain after modelling experimental data with Luedeking–Piret equation. Stoichiometric coefficients for both bacteria are indicated in Table 2.

**Table 1 Coefficient determination for  $\beta x_p$**

<i>A. nectaris</i>			<i>B. atrophaeus</i>		
[Sucrose] (g/L)	$\beta x_p$	<i>M<sub>p</sub></i>	[Sucrose] (g/L)	$\beta x_p$	<i>M<sub>p</sub></i>
120	6.079	−5E−17	120	1.3427	−0.0004
150	6.079	+2E−16	150	1.3915	−0.0071
180	6.079	+1E−16	180	1.3032	−0.0069
210	6.079	−6E−17	210	1.4255	−0.0052
240	6.079	+2E−16	240	1.4133	−0.0059
270	6.079	−8E−17	270	1.2588	−0.0007
Medium value	6.079	+5.2E−17	Medium value	1.3558	−0.0044

**Table 2 Stoichiometric coefficients determined from experimental data (expressed in Cmol substance/Cmol sucrose)**

	<i>A. nectaris</i>	<i>B. atrophaeus</i>
$\alpha$	0.02	≈0
$\beta$	0.0105	0.047
$\gamma$	0.105	0.470
$\delta$	0.562	0.562
$\varepsilon$	0.301	0.180
$\omega$	0.033	≈0

Respiration quotient (RQ), which is defined as quotient between  $\alpha$  and  $\omega$ , could be determined, with the following results: for *A. nectaris* RQ = 1.69 and for *B. atrophaeus* it was not possible to calculate because both values are approx. 0.

#### Levan characterization

After levan isolation and purification, several analytical techniques were used to check polymer structure. Figure 3 shows spectrums for levan extracted (A: infrared spectrum, B: H-NMR, C: C-NMR).

These figures confirm the production of levan from the selected strains due to the similarities between the obtained IR spectrum and the different spectra from literature [4, 21]. Same similarities were found for the nuclear magnetic resonance (NMR) spectra. The six <sup>13</sup>C NMR characteristic levan broad signals were at the different ppm (62.3, 64.7, 75.1, 75.5, 79.8, 105.9). Those signals were described in literature [20].

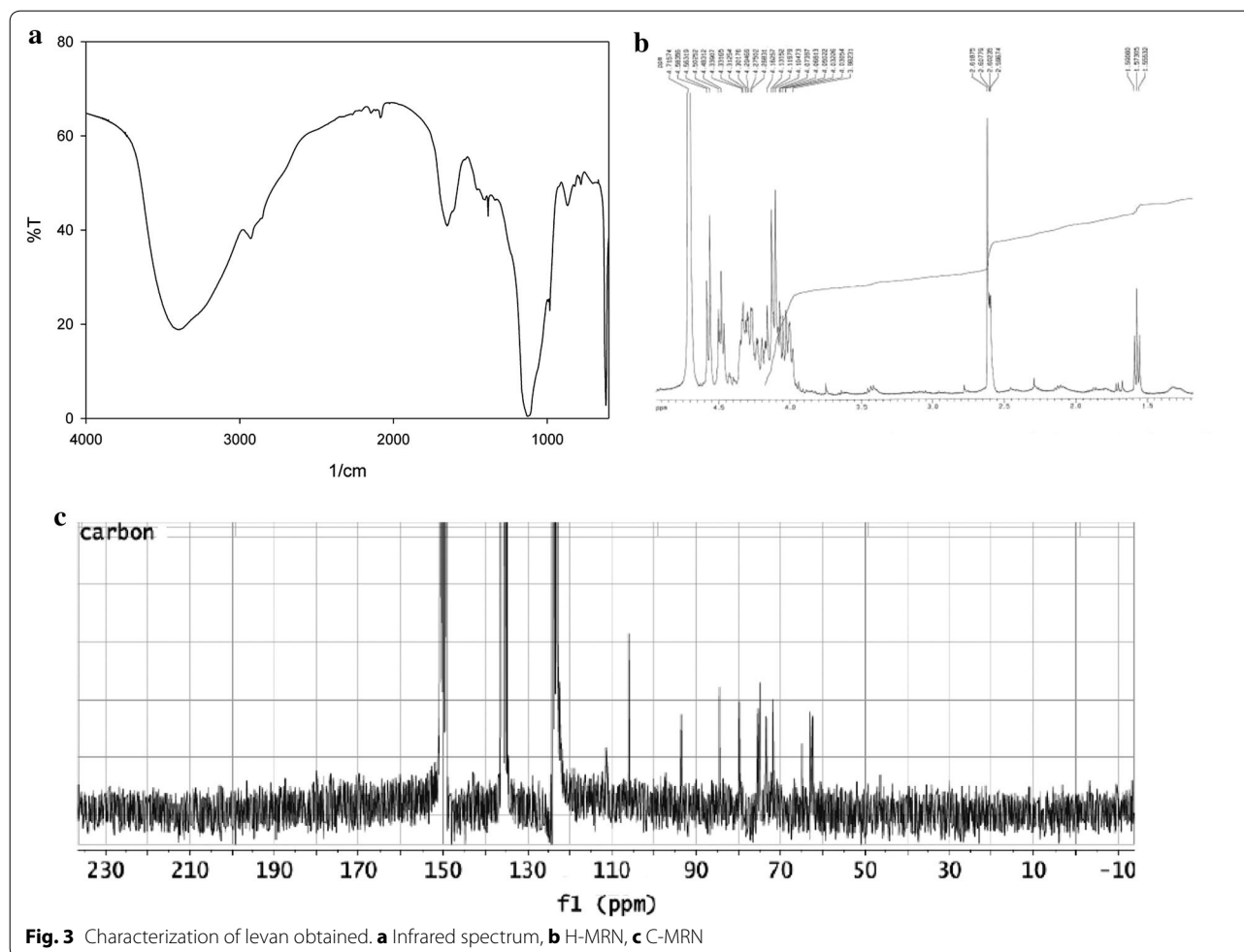
#### Influence of substrate concentration in levan molecular weight for both strains

Levan molecular weight for each strain and at the different sucrose concentrations was determined by static light scattering (SLS). Figure 4 shows the effect of the sucrose concentration on levan molecular weight.

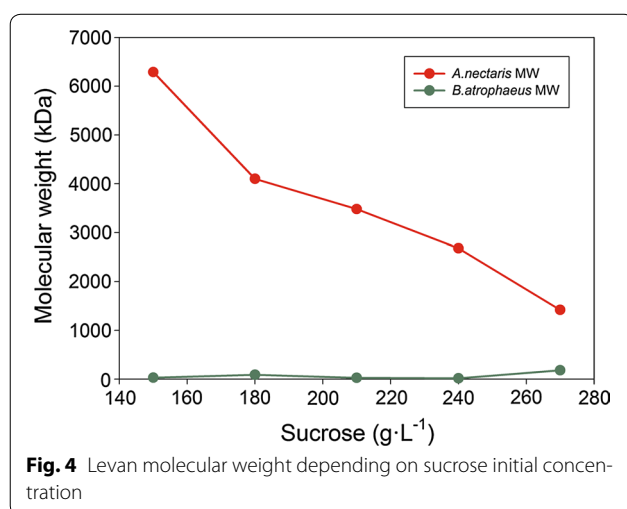
As can be observed, several differences can be found for both strains. *A. nectaris* molecular weight was higher than the *B. atrophaeus* molecular weight. *A. nectaris* levan molecular weight ranged 1000–6000 kDa, whereas *B. atrophaeus* produced a levan with a molecular weight ranging from 15 to 90 kDa. Furthermore, an equation relating *A. nectaris* molecular weight with sucrose concentration (g L<sup>-1</sup>) was determined (Eq. 11).

$$y = -37.2x + 11406 \quad (11)$$

where *y* is the molecular weight in kDa, and *x* is the sucrose concentration in g L<sup>-1</sup>.



**Fig. 3** Characterization of levan obtained. **a** Infrared spectrum, **b** H-MRN, **c** C-MRN



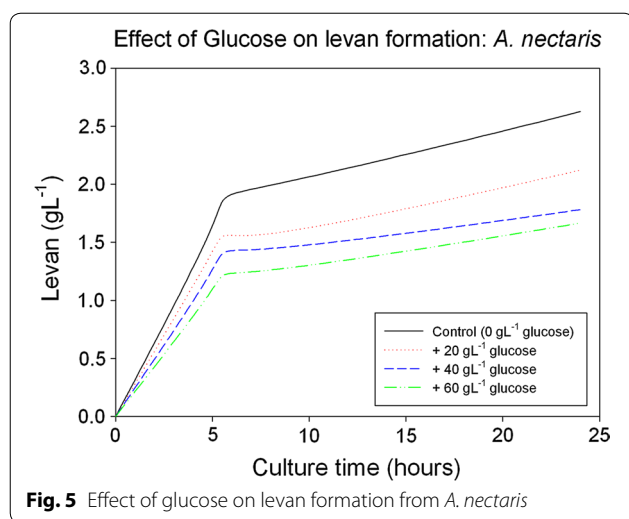
**Fig. 4** Levan molecular weight depending on sucrose initial concentration

#### Levan inhibition with glucose

Based on the previous results, sucrose can inhibit biomass and levan production in Gram negative bacteria (*A. nectaris*). However, it is unclear the mechanism of that inhibition. It is well-known [21] that glucose inhibits invertase in *Saccharomyces cerevisiae*. Invertase (EC.3.2.1.26) is an enzyme which catalyzes the sucrose breaking into glucose and fructose, but it does not polymerize that fructose.

Some experiments were performed in order to prove if levansucrase follows a similar mechanism for inhibition. Different concentrations of glucose were added to *A. nectaris* culture medium and levan production was determined. Results are shown in Fig. 5.

As can be seen in Fig. 5, levan production decreased by increasing glucose concentration (ranging from  $2.0 \text{ g L}^{-1}$



without glucose in the medium to around 1.2 with 60 g L<sup>-1</sup> of glucose in the medium).

Based on the previous experiments, an equation was obtained to predict the polymer formation depending on the glucose concentration (Eq. 12).

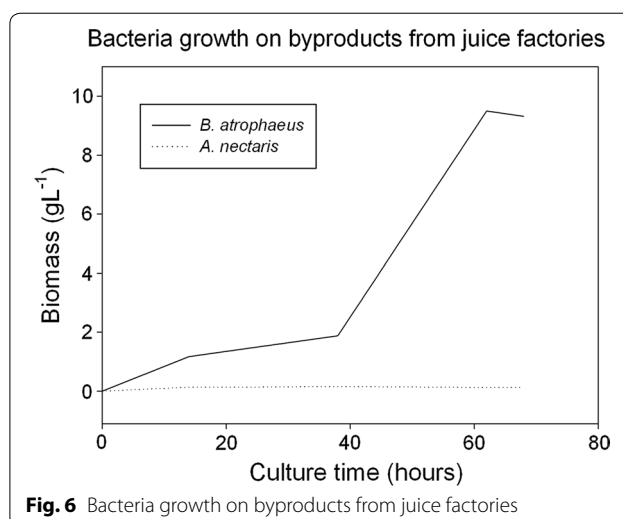
$$\frac{dp}{dt} = -0.0018[I] + 0.3255 \quad (12)$$

where [I] is glucose concentration in g glucose per liter. More data concerning these calculations are included in the Additional files 1, 2.

#### Wastes from juice factories as a substrate for cultivating both strains

*Acinetobacter nectaris* and *B. atrophaeus* were cultivated with wastes from an orange juice factory. The composition of this residual was analyzed with the aim of determining its molecular formula. After performing the analysis, the molecular formula was CH<sub>1.76</sub>O<sub>0.90</sub>N<sub>0.04</sub>. Due to the low nitrogen value, ammonium nitrate was used as a nitrogen source. That source has been described previously as good nitrogen source for bacteria growth [22]. Also, sucrose was added at 120 g L<sup>-1</sup> because that concentration provided the highest yield without inhibiting microorganism growth and polymer production. Figure 6 illustrates the results of cultivating both bacteria with this culture medium.

As can be observed in Fig. 6, *B. atrophaeus* grew in the new culture medium by using wastes from orange juice factories, with a similar growth rate in comparison with the results obtained for the same strain with the common medium (Fig. 1). However, *A. nectaris* did not grow when wastes are used because these residuals did not provide enough nutrients for that strain. Further studies must be done in order to determine which nutrients have to be added to grow *A. nectaris*.



After that, *B. atrophaeus* biomass was recovered and the levan was isolated and purified, producing 24.2 g levan L<sup>-1</sup>. This value is similar to the result obtained with the common culture medium.

Levan molecular weight obtained from *B. atrophaeus* was 200 kDa. This value is approximately two times the levan molecular weight that was synthesized with the common medium. Nevertheless, this molecular weight is still lower than levan molecular weight from *A. nectaris*.

## Discussion

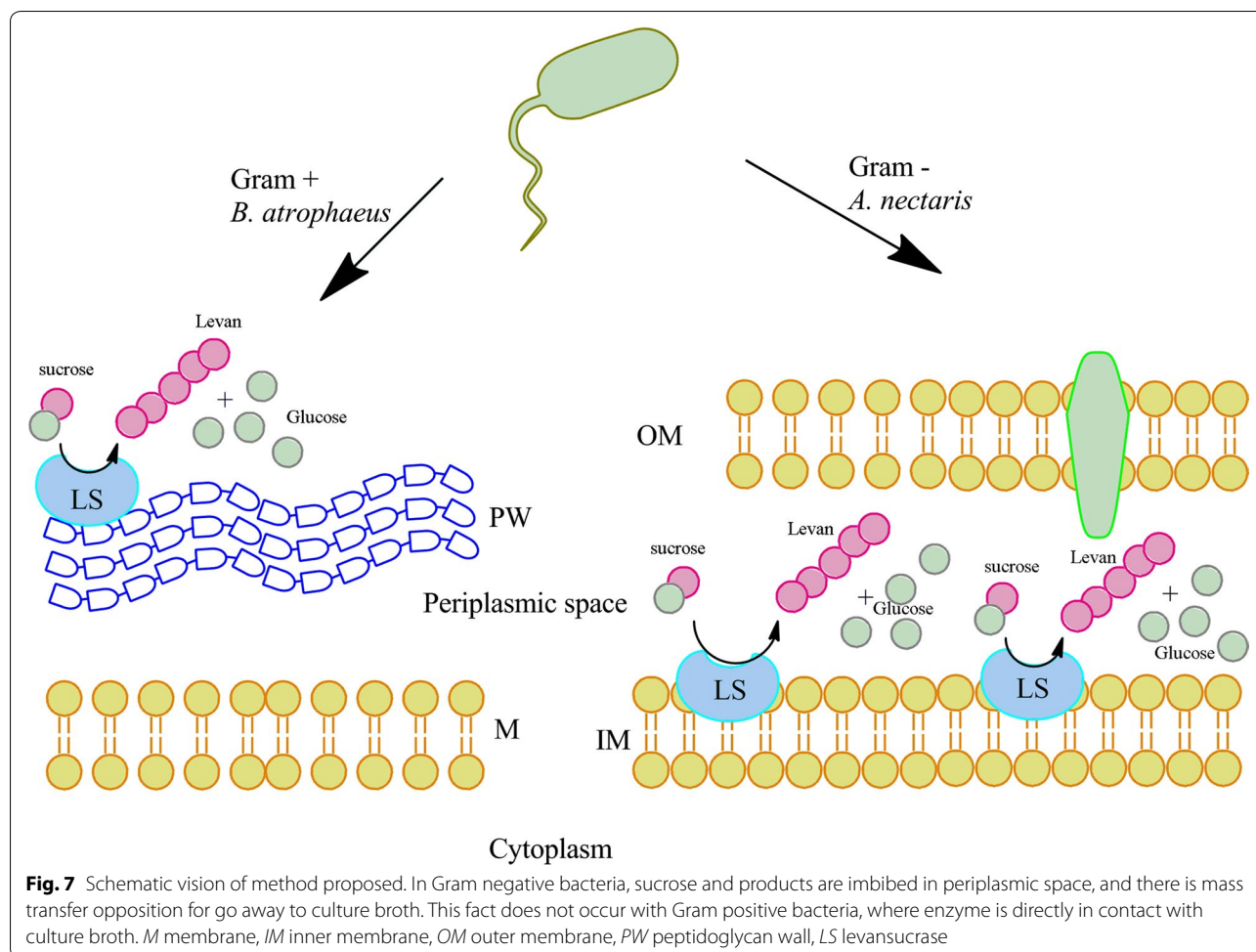
### Substrate effect on biomass yield

The results concerning the effect of substrate (Fig. 1) can be explained depending on the different bacteria type. *A. nectaris* is a Gram negative bacterium and as consequence the levansucrase can be located at their periplasmic space. On the other hand, *B. atrophaeus* is a Gram positive strain, so sucrose and enzyme cannot be in contact for a long time, due to the existence of a peptidoglycan wall. Therefore, the inhibition in *A. nectaris* was produced due to the accumulation in its periplasmic space. This contact can produce enzyme inhibition by substrate. This possible mechanism is illustrated in Fig. 7.

These results agree with the ones that have been proposed previously by Senthilkumar and Gunasekaran [23] with a classical Gram negative bacterium (*Zymomonas mobilis*). Furthermore, previous results with other Gram positive bacterium (*Bacillus subtilis*) show that biomass proliferation is independent from sucrose concentration [6].

### Substrate effect on levan yield

The results concerning levan production also confirm the hypothesis described in Fig. 7, where sucrose in periplasmic space does not only inhibit biomass growth but also levan production.



In comparison with literature, it is possible to find strains that produce a similar amount of levan. As an example, *B. subtilis* (natto) ATTC 7058 produced  $3.6 \text{ g L}^{-1}$  in 21 h [7],  $1\text{--}2 \text{ g L}^{-1}$  of levan was produced after cultivating *Pseudomonas fluorescens* in 30 h [4] whereas only around  $1 \text{ g L}^{-1}$  was obtained after extracting levan from *Halomonas* sp. AAD6 [3].

From kinetics results (observed in Table 1), it can be concluded that levan production is associated to the biomass growth. *A. nectaris* showed a better ratio product-biomass than *B. atrophaeus*, meaning that *A. nectaris* produced six times more levan for each biomass gram than *B. atrophaeus*. This fact suggested *A. nectaris* as an effective bacterium for levan production due to its high levan production for a lower biomass proliferation. Obtaining high amounts of levan without requiring a great biomass growth is a good strain quality for a future scale-up process. Moreover, results from Table 2 (RQ) confirm that product formation in *A. nectaris* was more efficient than in *B. atrophaeus*.

### Molecular weight

As it has been mentioned in results chapter, levan molecular weight from *A. nectaris* can be controlled by sucrose concentration. However, results showed that initial sucrose concentration did not modify levan molecular weight obtained from *B. atrophaeus*. This fact can be explained due to the cell wall and membrane structure. Levan polymerization in *A. nectaris* is located the periplasmic space, and as a consequence the polymer experience some difficulties to cross this space towards the culture broth. Therefore, the polymer could remain in the plasmatic membrane and can incorporate new fructose unit, increasing its molecular weight. The previous results highlighted a new possibility for controlling polymer molecular weight by modifying sucrose concentration in the medium culture.

### Glucose inhibition

Results from glucose experiments suggest that glucose may be one of the factors that can be involved in levan inhibition for Gram negative bacteria, and explain why



an increase of sucrose in the medium (and as a consequence more glucose) inhibits levan production for this type of bacteria. In this context, Eq. [12] can be used as a tool to determine levan and biomass yield depending on the glucose concentration.

### Waste from juice factories

Results from experiments that considered wastes from juice factories, highlight that there is a possibility of reducing the culture medium cost by using an alternative and inexpensive medium, such as residuals from the juice factories.

As a matter of fact, after performing some economic calculations, it is possible to reduce the cost of the medium culture (without considering sucrose) up to an 86%. This reduction ranges from 604 € m<sup>-3</sup> (rich medium) to 87 € m<sup>-3</sup> (new substrate source). If sucrose price is included, reduction reaches 10% (from 5000 to 4482 € m<sup>-3</sup>). Considering a four days process, the cost reduction is 129 € m<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup>. More details regarding these calculations are included in Additional file 2.

Although several works have studied the influence of different parameters (pH, temperature, substrate types and concentration) in levan production, the use of wastes from fruit factories has not been described yet.

### Conclusions

The effect of sucrose concentration and the bacteria type on levan yield and its molecular weight has been studied in this work. Two new strains (*A. nectaris* and *B. atrophaeus*) were selected and cultivated to synthesize levan. Specifically, they respectively produce around 3 and 3.5 g L<sup>-1</sup> of polymer. Results indicate that an increase of sucrose concentration decreases levan yield and molecular weight (from 8000 to 2000 kDa) for *A. nectaris* strain, whereas it does not produce a significant effect on *B. atrophaeus* growth and levan molecular weight (more or less 50 kDa at all the investigated conditions). The best sucrose concentrations were 120 g L<sup>-1</sup> for *A. nectaris* and around 180 g L<sup>-1</sup> for *B. atrophaeus*. The difference in those results is explained by taking into account the existence of peptidoglycan wall in Gram positive bacteria. Besides, by modelling growth kinetics, it can be concluded that *A. nectaris* follows a substrate-inhibition kinetics controlled by glucose whereas *B. atrophaeus* follows a typical Monod model. Finally, *B. atrophaeus* is able to grow (3 g L<sup>-1</sup> in 30 h) by using a medium culture with wastes from orange juice industry as an alternative culture medium, indicating the possibility of using wastes for growing bacteria with the aim of producing levan.

### Additional files

**Additional file 1.** Additional material A.

**Additional file 2.** Additional material B.

### Abbreviations

EPS: exopolysaccharide; PEG-PLA: polyethylene glycol-poly(lactic acid); CECT: Spanish microorganism collection culture; IR: infrared spectrum; NMR: nuclear magnetic resonance; FTIR: fourier transform infrared spectrum; SLS: static light scattering; MW: molecular weight;  $\mu$ : specific growth rate; D: dilution rate; x: biomass concentration; t: time;  $R_p$ : product rate; p: product concentration;  $\beta_{sp}$ : Luedeking-Piret coefficient;  $m_p$ : maintenance coefficient; Ks: monod constant; Ki: inhibition constant; Vmax: maximal velocity; Km: michaelis-menten constant; [I]: inhibitor concentration.

### Authors' contributions

AGG carried out experiment and wrote some sections of the manuscript. AT and JM<sup>a</sup>SA wrote other sections of the manuscript and supervised the experiments procedure. EM<sup>a</sup>MdV and MAG designed the experiment, supervise the experiments results and checked the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

The authors want to thank the Inorganic Chemistry Department of the University of Salamanca for his help with the IR experiments.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

### Consent for publication

All authors consent to publish this manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

The authors declare that they have no competing interests. This research has the ethics approval and all authors consent to participate.

### Funding

Authors want to acknowledge the funds from the Regional Government of Castilla y León (Spain), project reference SA004U16. Álvaro González-Garcinuño also acknowledges his Ph.D. grant (F.P.U.) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (Ref. FPU14/04914).

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 9 January 2017 Accepted: 15 May 2017

Published online: 23 May 2017

### References

1. Srikanth S, Sundhar Reddy CHSS, Siddhartha G, Ramaiah MJ, Babu Uppuluri K. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym*. 2015;120:102–14.
2. Gupta SK, Pal AK, Sahu NP, Dalvi RS, Akhtar MS, Jha AK, Baruah SK. Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. *Aquaculture*. 2010;306:398–402.
3. Poli A, Kazak H, Gürleyendag B, Tommonaro G, Pieretti G, Öner ET, Nicolaus B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydr Polym*. 2009;78:651–7.

4. Jathore NR, Bule MV, Tilay AV, Annapure US. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Sci Biotechnol*. 2012;21:1045–53.
5. Silbir S, Dagbagli S, Yegin S, Baysal T, Goksungur Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr Polym*. 2014;99:454–61.
6. Ing-Lung S, Yun-Ti Y, Chwen-Jen S, Chien-Yan H. Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8211–5.
7. Ing-Lung S, Tsaur-Chin W, Shou-Zoo C, Gen-Der L. Sequential production of two biopolymers-levan and poly- $\epsilon$ -lysine by microbial fermentation. *Bioresour Technol*. 2011;102:3966–9.
8. Esawy MA, Amer H, Gamal-Eldeen AM, El Enshasy HA, Helmy WA, Abo-Zeid MAM, Malek R, Abo-Zeid MAM, Malek R, Ahmed EF, Awad GEA. Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydr Polym*. 2013;95:578–87.
9. Nicholson M, Whitley KS, Gates TS. The combined influence of molecular weight and temperature on the physical aging and creep compliance of a glassy thermoplastic polyimide. *Mech Time Depend Mat*. 2001;5:199–227.
10. Calazans GMT, Lima RC, França FP, Lopes CE. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int J Biol Macromol*. 2000;27:245–7.
11. Elvassore N, Bertuccio A, Caliceti P. Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly (l-lactide) (PEG-PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques. *J Pharm Sci*. 2001;90:1628–36.
12. de Oliveira MR, da Silva S RSSF. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem Eng J*. 2007;37:177–93.
13. Xin L, Hong-ying H, Yang-Jia Y. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnol*. 2010;27:59–63.
14. Vigants A, Hicke HG, Marx SP. A simple and efficient Method for the Purification of Membrane-Bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr Microbiol*. 2001;42:415–8.
15. Vigants A, Marx SP, Linde R, Ore S, Bekers M, Vina I, Hicke HG. A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase. *Curr Microbiol*. 2003;47:198–202.
16. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol*. 1949;3:371.
17. Luedeking R, Piret EL. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Tech Eng*. 1959;1:393.
18. Nielsen J, Villadsen J. *Bioreaction engineering principles*. 2nd ed. New York: Plenum; 1994.
19. Kenneth AJ, Roger SG. The Original Michaelis Constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*. 2011;50(39):8264–9.
20. Zhang T, Li R, Qian H, Mu W, Miao M, Jiang B. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydr Polym*. 2014;101:975–81.
21. Elorza MV, Villanueva JR, Sentandre R. The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta*. 1977;475:103–12.
22. Gomaa EZ. Production of PHA by *Bacillus subtilis* and *E.coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Braz Arch Biol Technol*. 2014;57:1.
23. Senthilkumar V, Gunasekaran P. Bioethanol production from cellulosic substrates: engineered bacteria and process integration challenges. *J Sci Ind Res*. 2005;64:845–53.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

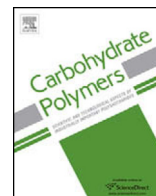
- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)









# Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies



Antonio Tabernero, Álvaro González-Garcinuño, José M<sup>a</sup> Sánchez-Álvarez, Miguel A. Galán, Eva M. Martín del Valle<sup>\*</sup>

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza Los Caídos s/n, 37008 Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 October 2016

Received in revised form 5 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

### Keywords:

Levan

Carboxymethyllevan

5-Fluorouracil

## ABSTRACT

New drug delivery systems (DDSs) with levan or its carboxymethylated form, as carriers, and 5-fluorouracil as a drug, are produced in this work. Levan is obtained after cultivating *A. nectaris* and polymer nanoparticles are created in water by a self-assembled process. The effect of pH and the ionic strength on polymer nanoparticles aggregation is studied. Basic pHs produces a particle size between 300 and 400 nm with a Z-potential around −20 mV because a basic medium promotes repulsion forces. DDSs of 300–400 nm and a Z-potential about −25 mV are prepared by taking advantage of the amphiphilic properties of the levan. The drug is bound to either levan or carboxymethyllevan surfaces by electrostatic interactions, obtaining the best results at basic pHs. 45–70% of the drug is released from the levan in 23 h depending on the pH preparation, whereas only a low percentage of the drug is released from the carboxymethyllevan.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over the past few decades, drug delivery systems (DDS) have been developed in order to achieve a proper release in terms of pharmacokinetics, and therefore improving the patient comfort and the effect of the drug in the human body. With a correct drug release, the delivery of the drug can be controlled either spatial and/or temporary, and as an example, toxic effects can be reduced amongst other advantages that have been already reported in literature (Martín del Valle, Galán, & Carbonell, 2009; Park, 2014).

A DDS is usually composed by a carrier and the drug that should be released in a controlled and predictable way. One typical example of a DDS is a micro (or nano)-capsule, comprising a polymeric membrane in which the drug is retained, forming a matrix device or a reservoir system depending on how the drug is placed inside the polymeric system (Tabernero, González-Garcinuño, Martín del Valle, & Galán, 2016). However, currently, new DDS systems in which the drug is bound to the carrier surface by means of different reactions have been proposed (Román, Rodríguez-Rodríguez et al., 2016; Román, Galán et al., 2016).

Polymeric materials for DDSs must be biodegradable and biocompatible. Many polymers have been used for this purpose, such as poly(lactic acid), poly(glycolic acid) or polycaprolactone (Correia et al., 2016; Imbrogno et al., 2015). Polysaccharides are natural-based polymers that have special advantages. They are similar to biological macromolecules and in addition they have similarities with the extracellular matrix, avoiding toxicity problems and immunological reactions. Chitosan, alginate and carboxymethylcellulose are some examples of polysaccharides that have been used for producing different types of DDS for biomedical applications. Different applications of these natural-based polymers can be found elsewhere (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008).

Those polysaccharides are mainly constituted by pyranose rings. Although that fact is not a disadvantage, polymers with furanose rings (fructose) can provide a significant advantage with respect to natural glucose polysaccharides to treat specific cancers. Several tumor cells (liver, breast or colorectal cells for instance) overexpressed the specific fructose transporter GLUT5 and as a consequence, a DDS with a fructose polymer and a drug might target only malignant cells, where the drug would be released (Kim, Bae, & Chung, 2015). In this context, levan is a fructose exopolysaccharide (formed by multiple units of fructose bonded  $\beta$  (2,6)) that is easily recovered from the broth after cultivating in acid medium (with sucrose as a nutrient source) a wide range of bacteria, such

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [emvalle@usal.es](mailto:emvalle@usal.es) (E.M. Martín del Valle).

as *Bacillus subtilis* or *Zymomonas mobilis*. Growth conditions and the effect of the different parameters on the levan production for different bacteria have been studied in different articles (Poli et al., 2009; Shih, Yu, Shieh, & Hsieh, 2005; Srikanth, Reddy, Siddartha, Ramaiah, & Uppuluri, 2015).

Several studies have been performed to study the potential applications of the levan for biomedical and pharmaceutical applications. Levan helps to heal both burns and wounds, it has anti-tumour activity properties and exerts anti-inflammatory effects. In addition, levan shows an amphiphilic nature, and forms nanoparticles by self-assembled in water. For that reason, their potential for producing DDS has to be considered (Calazans, Lima, De França, & Lopes, 2000; Kim et al., 2005; Srikanth et al., 2015).

In spite of the previous facts, levan has not been widely used for producing nanoparticles for the pharmaceutical industry and only a few levan-solid formulations have been proposed. Demir Sezer et al. (2015) loaded levan with vancomycin with an encapsulation efficiency ranging from 45% to 75% and with a particle size between 400 nm and 1.3  $\mu\text{m}$ . In this case, the Z-potential value was always between 4 and 6.5 mV. Demir Sezer, Kazah, Öner, and Akbuga (2011) also used levan to encapsulate bovine serum albumin (BSA), obtaining particles between 200 and 540 nm and with an entrapment efficiency ranging from 50% to 70%. Again, the Z-potential values were around 4–7 mV. Finally, Kim et al., 2015 formed nanoparticles of levan and indocyanine green for breast cancer diagnosis by taking advantage of the abovementioned affinity between fructose-GLUT5. Particles around 150–200 nm were obtained, but with a poor encapsulation efficiency (14–30%) whereas no Z-potential values were determined. However, they showed with *in vivo* experiments (with mice) that these nanoparticles targeted breast cancer cells.

The low Z-potential values (proper values are around 15–30 in absolute value (Verma, Gokhale, & Burgess, 2009)) of the previous articles indicate the particles tendency to form aggregates, what can hinder their use for different applications. A levan aggregation study can be useful to understand possible interactions between the drug to be entrapped and the used polymer. Moreover, studies concerning the effect of the pH or the ionic strength on the self-assembled process have not been performed with particles that can be used for cancer treatment.

Another interesting fact is that, to the best of our knowledge, no attempts have been proposed to modify the levan surface for binding different molecules to the polymer. As can be seen in some articles, the polymer surface modification is a required step to bind other compounds to the carrier. In this context, carboxymethylation is a reaction to transform the hydroxyl groups in methyl-carboxylic groups. Those carboxylic groups can promote the binding of different compounds to the modified surface by using different reactions (Román, Rodríguez-Rodríguez, Martín del Valle, & Galán, 2016). Molecules such as cyclodextrins have been already carboxymethylated in several articles for different purposes (Badruddoza, Hazel, Hidajat, & Uddin, 2010).

Therefore, this work proposes the development of a DDS composed by levan (or its carboxymethylated form) as a carrier and 5-fluorouracil (5-FU) as an antitumor drug. Levan is obtained by means of the fermentation of a bacterium that was isolated in the south of Spain (*Acinetobacter nectaris*). Levan nanoparticles aggregation studies and the effect of the pH and the ionic strength on the particle size and on the Z-potential are performed as well. Moreover, biocompatibility studies with a non-small cell lung cancer (H460 cell line) are performed in order to study levan toxicity. Finally, a carboxymethylation process to produce carboxymethyl-levan (CML) is proposed whereas the 5-FU release from both CML and levan nanoparticles systems is studied in order to find out if the DDSs can be useful for future medical applications.

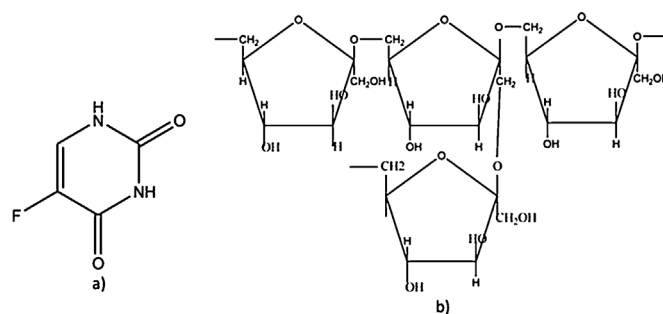


Fig. 1. Molecular structure of a) 5-FU and b) levan.

## 2. Experimental section

### 2.1. Materials

*Bacillus atrophaeus* (CECT 0038) and *Acinetobacter nectaris* (CECT 8127) were purchased from the Spanish Microorganism Collection Culture (CECT). 5-FU was purchased from Panreac with a purity higher than 99%. Yeast extract (Sigma-Aldrich),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich),  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich),  $\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich) and sucrose (with a purity of 99.5% from Sigma-Aldrich) were used to cultivate the different bacteria. HCl 37% (Analar Normapur) was used to prepare a HCl 1 M solution whereas KOH solution 8.0 N (Sigma-Aldrich) was used to prepare a 0.1 M KOH solution. On the other hand,  $\text{CaCl}_2$  anhydrous (Panreac) and NaOH (purity 99% from Merck) were used to precipitate and to increase the pH. Chloroacetic acid (purity of 99% from Sigma-Aldrich) and 1 kDa dialysis membranes (Sigma-Aldrich PURX35050-1kT) were used to carboxymethylate the polymer. For drug release experiments, phosphate buffer saline was purchased from Sigma-Aldrich.

Fig. 1 illustrates the molecular structures of the drug (5-FU) and the polymer used for producing the DDS.

### 2.2. Microorganism and culture medium

*Acinetobacter nectaris* (CECT 8127) was selected from the Spanish Microorganism Collection Culture (CECT) to be cultivated in order to produce levan. This Gram positive bacterium was isolated from nectar of some plants at Doñana Park in Huelva (Spain). This strain was cultured in flask recipients (volume 250 mL), using the following culture media: 7 g  $\text{L}^{-1}$  yeast extract, 2.5 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.6 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 0.4 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  and 150 g  $\text{L}^{-1}$  of sucrose as a carbon source. After that, the pH was adjusted between 5.5 and 6 (with 1 M HCl) because an acid medium is needed to secrete the levan-sucrose to the bacterial cell wall. Experiments were carried out at 30 °C and a stirring speed 150 rpm (Shih et al., 2005).

Biomass growth was determined by using the solids in suspension method (Xin, Hong-ying, & Yang-jia, 2010). The biomass absorbance was measured at 650 nm, and with a previous calibration, equation 1 was obtained. Eq. (1) is used to know the biomass of the strain at any stage of the culture.

$$y = 0.1091x - 0.0216 \quad (1)$$

Where y is the absorbance at 650 nm, and x is the biomass concentration expressed in mg/mL.

### 2.3. Levan isolation and purification

After reaching the stationary phase, the bacterium culture broth is centrifuged at 1280g over 10 min. Since levan is an exopolysaccharide, the biomass is discarded, and several subsequent processes have to be done with the supernatant phase to extract and isolate the polymer.

Firstly, the pH must be increased up to 9.5–10.5 by using a 0.1 M KOH. After that, 1 mL  $\text{CaCl}_2$  (1% w/w) was added each 20 mL of supernatant and ethanol (96% v/v) is added to the mixture (proportion ethanol:supernatant 3:1). Finally, that mixture is kept at  $-20^\circ\text{C}$  over 24 h and the polymer is subsequently isolated by means of a centrifugation at 7700g during 10 min. In order to remove the water from the polymer, the obtained wet solid is lyophilized (Telstar Lyophilizaer) at  $-55^\circ\text{C}$  and 0.020 bar. This procedure was previously described by Jathore, Bule, Tilay, and Annapure (2012).

#### 2.4. Carboxymethylation of levan

The carboxymethylation of levan is performed by following a modified procedure described by Badruddoza et al. (2010). In order to do that, 1 mg of levan is dissolved in an aqueous dissolution of NaOH (50% wt) over 24 h while stirring at 500 rpm. After that, 350 mg of chloroacetic acid is dissolved in 1 mL of water and the resulting mixture is added dropwise (under stirring at 700 rpm) to the previous solution of levan for 48 h.

In order to remove the remaining ions and the excess of chloroacetic acid, the final solution is dialyzed against ultrapure water (water was changed two times after 3 h) by using a 1 kDa dialysis membranes. Finally, the CML is obtained by lyophilization.

#### 2.5. DDS preparation and drug release studies

With the aim of preparing DDS with levan-5-FU or CML-5FU, an aqueous solution of 5-FU ( $10\text{ mg L}^{-1}$ ) is added dropwise to a solution of  $0.5\text{ g L}^{-1}$  of levan in water while stirring at 500 rpm over 1 h. After that, the particles are recovered by centrifugation at 5800g during 8 min. That biopolymer concentration was chosen because is close to the maximum solubility of the levan in water (that concentration has been used in other articles (Demir Sezer et al., 2011; Kim et al., 2015)). Since the formulation must be prepared to assure a suitable proportion polymer:drug (meaning a good dispersion of the drug within the biopolymer), the concentration of the polymer is chosen to be 50 times the concentration of the 5-FU.

Drug release studies are performed by suspending  $0.5\text{ g L}^{-1}$  of DDS particles in phosphate buffer saline (pH 7.4 and 50 mM), at  $37^\circ\text{C}$  (physiological temperature). The cumulative 5-FU release was calculated by measuring the absorbance of the supernatant at 266 nm (maximum absorbance wavelength for the 5-FU) at different times.

#### 2.6. Dynamic light scattering to determine particle size, aggregation and Z-potential

Particle size, Z-potential and the aggregation of the polymer is determined by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer nano (Malvern Instruments). In order to study levan nanoparticles aggregation, a 4 min delay is set between each experiment.

The Z-potential of the biopolymer and the different systems is determined by obtaining the electrophoretic mobility with laser Doppler velocimetry (LDV) with the same equipment previously used Zetasizer nano (Malvern Instruments).

#### 2.7. Polymer identification and transmission electron microscopy (TEM)

Levan is a homopolysaccharide formed by multiple units of fructose bonded  $\beta$  (2–6). Infrared spectrum is carried out in order to determine the nature of the polymer extracted from culture broth.

FT-IR spectrum is recorded in a Perkin-Elmer Spectra ONE instrument, using KBr pellets; 32 spectra (recorded with a nominal resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ ) are averaged to improve the signal-to-noise ratio.

Particle and DDS morphology was characterized by transmission electron microscopy (TEM, Zeiss EM902 at 80 kV) after loading a droplet of the suspension on a grid with a subsequent drying process with air.

#### 2.8. Levan biocompatibility studies

In order to determine levan biocompatibility, some *in vitro* studies were carried out with cancer cells from lung cancer NSCLC (non-small cell lung cancer) H460. Firstly, cells were cultured in RPMI medium, at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Cells grew until reaching a value of  $8000\text{ cells mL}^{-1}$  and after that, different amounts of levan were added to determine the effect of the polymer on the cells toxicity.

Then, samples were taken each 24 h in order to determine cell viability with a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. MTT reactive is able to quantify the amount of alive cells by the analysis of their mitochondria. MTT reactive is measured at 595 nm and the absorbance is related with the cell viability percentage.

With the purpose of having results comparable between them, samples results were normalized to control one (by remaining its cell viability percentage at a constant value at 100%).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Biomass growth and levan production. CML production. Identification

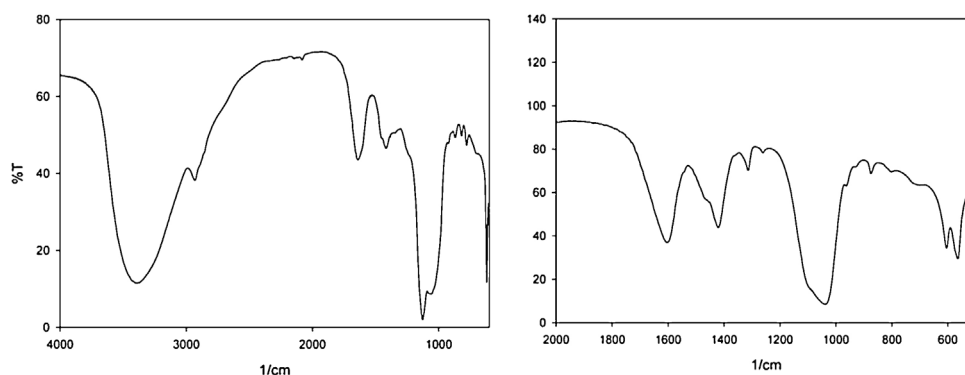
First results are concerning the possibility of producing levan from the microorganism *A. nectaris*. A biomass growth of nearly  $3.0\text{ g L}^{-1}$  was obtained after 40 h of cultivation, obtaining almost  $2.5\text{ g L}^{-1}$  of levan. This strain grew faster than other microorganisms, such as *Halomonas* sp. AAD6 strain (Poli et al., 2009) ( $1.108\text{ g L}^{-1}$  in 40 h) and produced more levan in the same time ( $0.75\text{ g L}^{-1}$ ).

In order to identify the exopolysaccharide, IR spectrum of the solid was performed (Fig. 2a). This figure confirms the production of levan from *A. nectaris* due to the similarities between the obtained IR spectrum and the different spectra from literature (Jathore et al., 2012; Zhang et al., 2014). Moreover, Fig. 2b shows the IR spectrum of the CML, ranging from  $2000\text{ cm}^{-1}$  to  $500\text{ cm}^{-1}$  (carboxylic group is located around  $1200\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ ). As can be observed, the differences between those figures indicate the carboxymethylation of the fructose polymer. More confirmations that the reaction took place will be explained in the following sections.

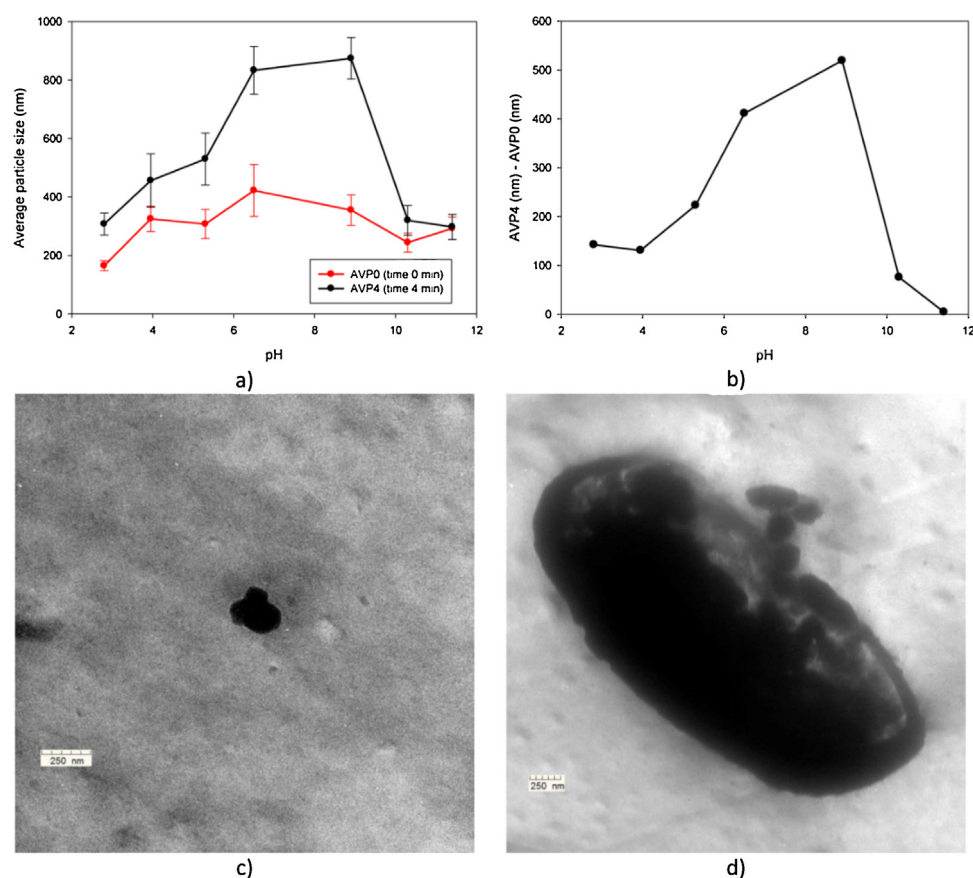
#### 3.2. Effect of ionic strength and pH on particle size and aggregation of levan and CML

The levan ability to form nanoparticles (size ranging between 100 nm and 500 nm) by self-assembled in water due to its amphiphilic nature has been previously reported (Kim et al., 2015). However, to the best of our knowledge, an aggregation study of those nanoparticles has not been published yet. First results are concerning the effect of the pH on the particles aggregation.

Fig. 3a shows how the pH modifies the nanoparticle aggregation in 4 min. The average particle size distribution at 4 min (AVP4) is always higher than the initial (time 0 min) average particle size distribution (AVP0), indicating nanoparticle aggregation. On the other hand, Fig. 3b shows the difference between the AVP4 and AVP0. According to the results, the maximum aggregation is obtained at pHs between 5 and 9 with a final average particle size (after 4 min time) between 500 and 900 nm. That aggregation occurs because the polymer molecules are not charged and as a consequence they interact between themselves and they form an aggregate. However, at lower pHs (ranging from 3 to 5) the



**Fig. 2.** Spectra of a) Levan and b) CML (ranging from 2000  $\text{cm}^{-1}$  to 500  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Fig. 3.** a) Effect of pH on nanoparticle aggregation b) Effect of pH on the difference between the average particle size at 4 min (AVP4) and the average particle size at time 0 (AVP0) c) Isolated levan particle at pH 11 and d) levan aggregate at pH 7.

aggregation phenomenon decreases. That fact can be explained by taking into account that levan can be hydrolyzed by an acid, as was reported by [Lauren, Stivala, Bahary, and Long \(1975\)](#). However, for higher pHs, the aggregation decreases because the basic medium can take an hydrogen atom from the hydroxyl groups of the levan. The polymer gets a negative charge and a repulsion force is created between the different molecules. [Fig. 3c](#) and [d](#) shows respectively TEM images of an isolated particle of levan for an experiment at pH 11 (no aggregation) and an aggregate at pH 7. [Fig. 3d](#) clearly illustrates how levan nanoparticles can aggregate between themselves to create a big particle. In this context, more measures were performed at 8 min obtaining the same particle size.

More experiments were done to study the effect of the ionic strength (by adding different NaCl concentrations) on the particle

aggregation at different pHs ([Fig. 4a](#)). According to the results, at basic pHs there is not particle aggregation at concentrations under 2 M. However, nanoparticle aggregation increases for a higher ionic strength because sodium ions can compensate the negative charges, avoiding the repulsion force.

For acid pHs, there is not a clear effect of the ionic strength on particle aggregation. That is probable due to the different particles that can be produced by the polymer hydrolysis.

Finally, at medium pHs, increasing salt concentration decreases particle aggregation up to a concentration around 3 M. After that, ionic strength increases the aggregation phenomenon. As happened in [Fig. 3](#), the maximum nanoparticle aggregation is obtained at medium pHs.



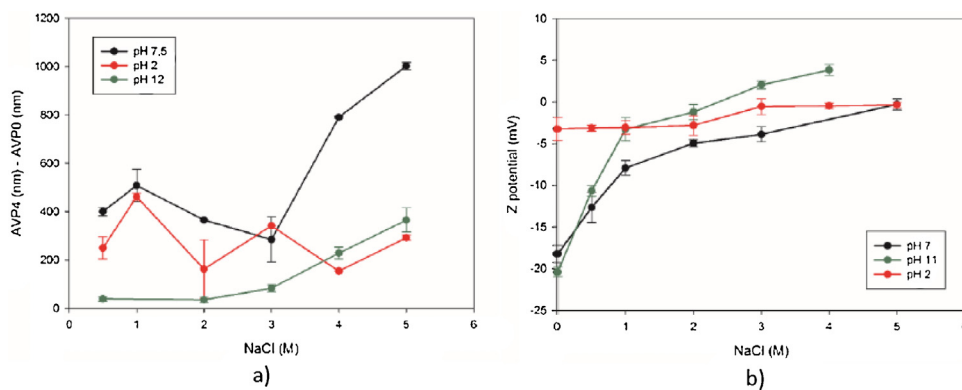


Fig. 4. a) Effect of the ionic strength on particle aggregation at different pHs b) Effect of ionic strength and pH on Z-potential.

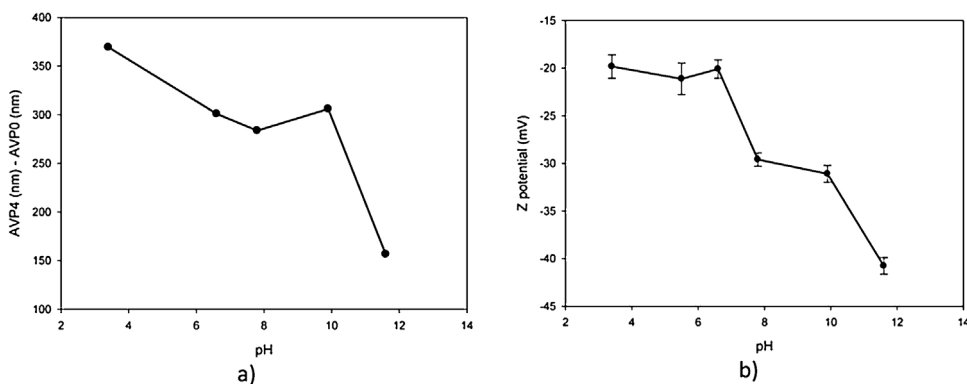


Fig. 5. a) Effect of pH on CML nanoparticles aggregation and b) effect of pH on CML Z-potential.

Previous results were confirmed by studying the influence of the pH and the ionic strength on the Z-potential. As can be seen in Fig. 4b, the lowest Z-potential (around  $-20$  mV) was obtained at high values of pHs. This value is higher than the established value for avoiding particles aggregation ( $20$  mV in absolute value). On the other hand, Z-potential absolute value decreases at lower pHs, promoting nanoparticles aggregation. It is important to realize that at pH 7.5, the Z-potential is around  $-20$  mV, that is the threshold value between aggregation and no aggregation, what explains the particle aggregation at that pH even for high absolute values of Z-potential. Concerning the effect of the ionic strength on the Z-potential, it was shown that ionic strength reduces the absolute value of the Z-potential because the  $\text{Na}^+$  ions compensate the negative charges of the molecule by forming ionic interactions.

In sum, previous results highlight that the best conditions to produce levan nanoparticles by self-assembly in water are high values of pHs and low values of strength ionic. Those experimental conditions will produce nanoparticles with a size around  $300$ – $400$  nm and with a satisfactory Z-potential value ( $-20$  mV). No bimodal distributions were observed for the previous experiments. Besides, more measures were performed at 8 min. No significant differences were found concerning Z-potential and particle aggregation results.

Similar experiments were conducted with CML. As happened with levan, particles size distributions between  $300$  and  $900$  nm are obtained, and higher pH values decreases CML nanoparticles aggregation (Fig. 5a), obtaining particles with a final average particle size distribution between  $300$  and  $400$  nm. That fact can be explained by taking into account the proton loss of the hydroxyl group at basic mediums. On the other hand, Fig. 5b shows the influence of the pH on the CML Z-potential. As can be observed, CML Z-potential values are higher than the values for levan Z-potential at the same conditions due to the existence of the carboxylic group. These results are

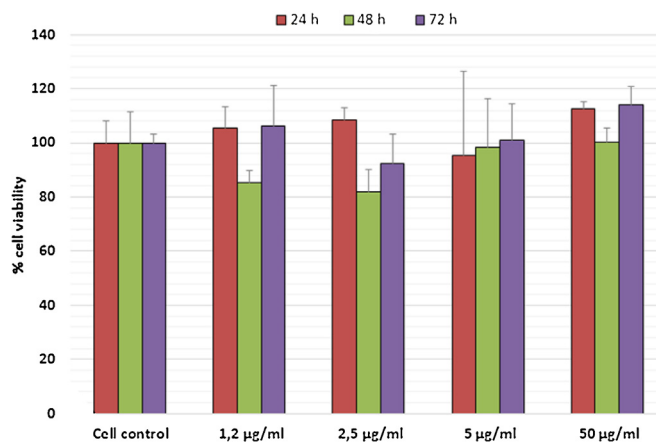


Fig. 6. Levan biocompatibility test.

another way to confirm that the carboxymethylation reaction was successfully performed. In this case, the effect of the ionic strength on CML particle aggregation was not studied because it was considered that CML and levan results will be similar. As happened with levan, no significant differences were found between results at 8 min and 4 min.

### 3.3. Levan biocompatibility studies

The polymer biocompatibility was studied by performing a cell viability test with H460 cell line from non-small cell lung cancer. As it can be observed in Fig. 6, the addition of different concentrations of levan has no significant effect on cell proliferation during three days. Cells with levan have a growth rate similar to the control

one. Cell viabilities are the following after three days with different polymer concentrations: Control: 100%;  $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ : 106%;  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ : 93%;  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ : 101%;  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ : 114%.

Since the percentages are between 95% and 115%, it is possible to conclude that levan is a biocompatible polymer, and it will not cause problems of toxicity or immunological compatibility.

### 3.4. Drug delivery system studies

Although levan is a promising biopolymer for encapsulating drugs, its use is not extended for that matter. In this work, the amphiphilic properties of the levan are used for producing a DDS system levan-5-FU and CML-5-FU with the subsequent aggregation studies.

#### 3.4.1. Levan-5-FU

Results for the system levan-5-FU are shown in Fig. 7. As can be seen in Fig. 7a, aggregation increases from pH 7 to pH 10, with a particle size ranging from 700 to 800 nm. Again, the aggregation decreases for high pH values, obtaining particles with a final size about 400 nm at those experimental conditions. Comparing with literature, the particle size is similar to the results obtained from the systems levan-BSA (Demir Sezer et al., 2011) and levan-vancomycin (Demir Sezer et al., 2015), although the size is higher than the system levan-indocyanine green (Kim et al., 2015).

According to Fig. 7b, the drug anchored in the DDS ranges from 40 to 80% depending on the pH, obtaining the maximum value at pHs between 10 and 12. This percentage is higher than the percentage for the system with indocyanine green (maximum around 30%) (Kim et al., 2015) and is similar to the systems with BSA and vancomycin (maximums around 70% and 75% respectively) (Demir Sezer et al., 2011; Demir Sezer et al., 2015).

Fig. 7c shows the Z-potential values for the DDS levan-5-FU. As can be observed, values of  $-30 \text{ mV}$  can be obtained, that is a higher value than the levan Z potential (Fig. 4b). In addition, these values are far higher (in absolute values) than the obtained values in literature (ranging from  $4 \text{ mV}$  to  $8 \text{ mV}$ ) (Demir Sezer et al., 2011; Demir Sezer et al., 2015; Kim et al., 2015). That fact is an important advantage, since subsequent aggregation processes can be avoided. The explanation for this fact is based on the partial negative charge of the fluoride in the 5-FU and electrostatic interactions. 5-FU molecule has a fluoride atom bound to a ring which is composed by carbon and nitrogen atoms. Therefore, the nitrogen with positive charge can be bound to the levan oxygen atoms with negative charge by electrostatic interactions, to form a complex in which the fluoride atom is located in the outer surface of the DDS. In this context, the partial electronegativity of the fluoride atom provides the high negative values of the Z-potential.

Since basic pHs increases the proton loss of the levan hydroxyl groups, more oxygen atoms can be available for the nitrogen-oxygen bond, and as a consequence, the Z-potential of the DDS increases. In sum, electrostatic interactions cause the binding between the drug and the levan surface, increasing the Z-potential and avoiding future nanoparticles aggregation processes.

More measures were performed at 8 min without finding significant differences in Z-potential and nanoparticle aggregation results in comparison with 4 min results.

The process of binding drugs to a surface has been proposed before (Román, Galán, & Martín del Valle, 2016). In that case, cisplatin was bound to alginate microparticles, obtaining a lower toxicity of the DDS in comparison with free cisplatin after performing *in vitro* studies (Román, Galán et al., 2016). More examples of this strategy can be found in (Chipman, Oldham, Pezzoni, & Singer, 2006; Larson and Ghandehari, 2012).

Finally, Fig. 7d illustrates a TEM image for isolated particles of levan-5-FU (pH 11) whereas Fig. 7e shows a TEM image of how

several levan-5-FU particles create an aggregate (pH 7) as happened in Fig. 3d.

Last results are concerning the 5-FU release from the DDS. Fig. 7f shows how the nanoparticles pH preparation modifies the drug release. The maximum release is obtained at 23 h for particles prepared at medium pHs (around 70%). However, for basic pHs, the maximum release remains constant (50% at 23 h). Differences are caused by the different electrostatic interactions nitrogen-oxygen. Basic pHs will provide a stronger bind, and the drug will be more slowly released. These results show how the pH preparation can be used for modifying the drug release.

In comparison with literature, 5-FU releases from levan faster than BSA. Days are required for the system levan-BSA for releasing a high percentage of the drug (Demir Sezer et al., 2011). Differences are attributed to the different type of DDSs created. The BSA is microencapsulated within the levan, so the drug is slowly released from the reservoir. However, for the system levan-5-FU the drug is bound to the polymer surface, so the interactions are weaker and the drug releases faster.

Although the drug release may be quick, it is important to specify that sometimes a quick release is needed to stop the initial cell proliferation, as happened with aggressive tumors, such as lung cancer (Román, Galán et al., 2016).

#### 3.4.2. CML-5-FU

A similar study is performed for the system CML-5-FU (Fig. 8). Nanoparticles with an average particle size distribution of 500 nm were obtained after preparing the DDS. However, in this case the effect of the pH on the nanoparticle aggregation was not studied, considering that the best conditions to avoid nanoparticle aggregation are basic pHs, as happened with the system levan-5-FU.

On the other hand, the variation of the drug percentage anchored with the pH is shown in Fig. 8a. That percentage ranges from 50% at pH 4–65% at pH 12. This trend was also found for the system levan-5-FU (although a higher amount of drug is anchored with the levan).

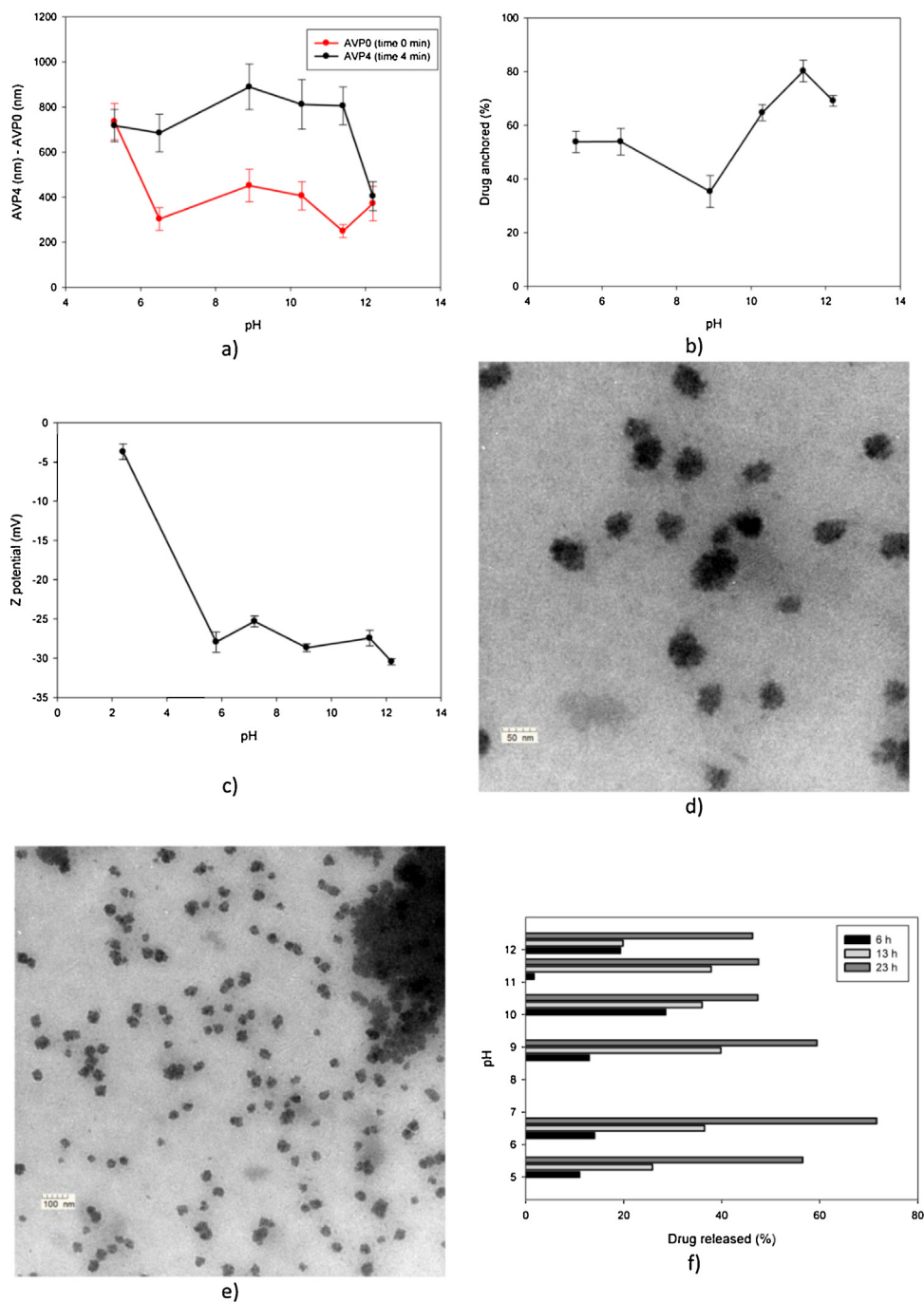
Final results are concerning the effect of the pH on the Z-potential of the DDS CML-5-FU. Fig. 8b shows how the Z-potential increases (in absolute value) with increasing pH. As happened for the previous system, the drug binds to the polymer surface due to electrostatic interactions nitrogen-oxygen, forming an amide in CML case. The fluoride atom remains oriented towards the outside of the DDS, so its electronegativity causes an increase in the Z-potential. Besides, that binding process occurs at a higher extent at basic pHs because the basic medium can take the proton from the CML.

More experiments were done in order to quantify the 5-FU release from this DDS. However, after 3 days, no drug is significantly released from the CML. The explanation is the amide bond stability, that avoids the drug detachment from the DDS.

Therefore, similar results were found for the systems CML-5-FU and levan-5-FU in terms of drug entrapped percentage, Z-potential, particle size and aggregation behavior. For both DDSs the drug binds to the polymer surface due to electrostatic interactions nitrogen-oxygen instead of remaining within the polymer. A difference was found for the 5-FU release from the system with CML. In that case, there is a significant reduction in drug release due to the strong stability of the amide bond.

## 4. Conclusions

This work proposes the development of a new DDS composed by levan (a fructose polymer with amphiphilic properties obtained by cultivating *A. nectaris*) or its carboxymethylated form (CML) and 5-FU as well as studying the effect of the pH and the ionic



**Fig. 7.** a) Effect of pH on levan-5-FU particles aggregation, b) Effect of pH on drug anchored percentage, c) Effect of pH on levan-5-FU Z-potential, d) TEM image of particles of levan 5-FU at pH 11, e) TEM image of particles of levan-5-FU at pH 7, f) 5-FU cumulative release at different pH preparations.

strength on the aggregation behavior of the different polymers and the DDSs. Results indicate the ability of *A.nectaris* to produce levan ( $2.5 \text{ g L}^{-1}$  in 40 h), and the successful carboxymethylation of the produced polymer to create CML. Basic pHs (higher than 10) are the best conditions to avoid nanoparticles aggregation according to the values of the Z-potential and average particle size. The worst results were obtained at acid pHs. Those facts were explained in terms of polymer hydrolysis at acid pHs and the proton loss from the polymer at basic pHs. Specifically, levan or CML nanoparticles between 300 and 400 nm with a Z potential value of  $-20 \text{ mV}$  are obtained by operating at the best experimental conditions. DDSs systems levan-5-FU and CML-5-FU were produced by implementing an easy methodology. Again, a pH higher than 10 is the

best value to produce the nanoparticles according to nanoparticles aggregation and Z-potential results. Moreover, it was shown that the drug was bound to the polymer surface by means of electrostatic interactions instead of being placed within the polymer. A better release (between 45 and 70%) was found with the system levan-5-FU in comparison with the system CML-5-FU (amides have stronger amide bonds, avoiding a release process).

#### Acknowledgements

Álvaro González-Garcinuño acknowledges his PhD grant (F.P.U.) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (Ref. FPU14/04914). Authors acknowledge the funds from the Regional

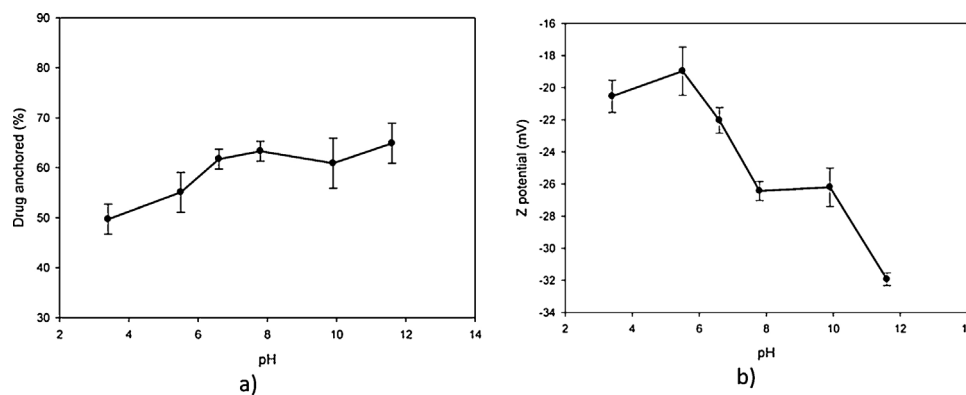


Fig. 8. Effect of pH on: a) drug anchored percentage b) Z-potential of CML-5-FU.

Government of Castilla y León (Spain), project reference SA004U16. Authors want to thank the Department of Inorganic Chemistry of the University of Salamanca for his help with the IR experiments.

## References

- Badruddoza, A. Z. M., Hazel, G. S. S., Hidajat, K., & Uddin, M. S. (2010). Synthesis of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin conjugated magnetic nano-adsorbent for removal of methylene blue. *Colloids and Surfaces A*, 367, 85–95.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., De França, F. P., & Lopes, C. E. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 245–247.
- Chipman, S., Oldham, F. B., Pezzoni, G., & Singer, J. W. (2006). Biological and clinical characterization of paclitaxel polyglumex (PPX, CT-1203), a macromolecular polymer-drug conjugate. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 375–383.
- Correia, D. M., Sencadas, V., Ribeiro, C., Martins, P. M., Martins, P., Gama, F. M., et al. (2016). Processing and size range separation of pristine and magnetic poly(L-lactic acid) based microspheres for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 476, 79–86.
- Demir Sezer, A., Kazak, H., Öner, E. T., & Akbuga, A. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84, 358–363.
- Demir Sezer, A., Sarilmiser, H. K., Rayaman, E., Çevikbas, A., Öner, E. T., & Akbuga, J. (2015). Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2015.1116564>, in press
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388–398.
- Imbrogno, A., Dragosavac, M. M., Piacentini, E., Vladislavjevic, G. T., Holdich, R. G., & Giorno, L. (2015). Polycaprolactone multicore-matrix particle for the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds produced by membrane emulsification and diffusion process. *Colloids and Surfaces B*, 135, 116–125.
- Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V., & Annapure, U. S. (2012). Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1045–1053.
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., & Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science*, 56, 395–406.
- Kim, S.-J., Bae, P.-K., & Chung, B. H. (2015). Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications*, 51, 107–110.
- Larson, N., & Ghandehari, H. (2012). Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials*, 24, 840–853.
- Lauren, M. D., Stivala, S. S., Bahary, W. S., & Long, L. W. (1975). Kinetics of the acid hydrolysis of *Streptococcus salivarius* levan. *Biopolymers*, 14, 2373–2385.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 1650–1662.
- Martín del Valle, E. M., Galán, M. A., & Carbonell, R. (2009). Drug delivery technologies: The way forward in the new decade. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 2575–2486.
- Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190, 3–8.
- Poli, A., Kazak, H., Gürlendag, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., et al. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78, 651–657.
- Román, J. V., Rodríguez-Rodríguez, J., Martín del Valle, E. M., & Galán, M. A. (2016). Synthesis of a new nanoparticle system based on electrostatic alginate-piperazine interactions. *Polymers for Advanced Technologies*, 27, 623–629.
- Román, J. V., Galán, M. A., & Martín del Valle, E. M. (2016). Preparation and preliminary evaluation of alginate crosslinked microcapsules as potential drug delivery system (DDS) for human lung cancer therapy. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2, 1–13.
- Shih, I.-L., Yu, Y.-T., Shieh, C. J., & Hsieh, C.-Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus Subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8211–8215.
- Srikanth, R., Reddy, C. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production: characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102–114.
- Tabernero, A., González-Garcinuño, A., Martín del Valle, E. M., & Galán, M. A. (2016). Survey of supercritical fluids techniques for producing drug delivery systems for a potential use in cancer therapy. *Reviews in Chemical Engineering*. <http://dx.doi.org/10.1515/revce-2015-0059>, in press
- Verma, S., Gokhale, R., & Burgess, D. J. (2009). A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspension. *International Journal of Pharmaceutics*, 380, 216–222.
- Xin, L., Hong-ying, H., & Yang-jia, Y. (2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 27, 59–63.
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M., & Jiang, B. (2014). Biosynthesis of levan by levansucrose from *Bacillus methylotrophicus* SK 21. 002. *Carbohydrate Polymers*, 101, 975–981.





Article

# Levan-Capped Silver Nanoparticles for Bactericidal Formulations: Release and Activity Modelling

Álvaro González-Garcinuño <sup>1</sup>, Rubén Masa <sup>1</sup>, María Hernández <sup>1</sup>, Ángel Domínguez <sup>2</sup>,  
Antonio Tabernero <sup>1</sup> and Eva Martín del Valle <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; alvaro\_gonzalez@usal.es (Á.G.-G.); ruben.masa.gonzalez@gmail.com (R.M.); mariahg93@hotmail.com (M.H.); antaber@usal.es (A.T.)

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; ado@usal.es

<sup>3</sup> Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

\* Correspondence: emvalle@usal.es; Tel.: +34-923294479

Received: 27 February 2019; Accepted: 22 March 2019; Published: 26 March 2019



**Abstract:** An environmentally friendly technique was used to produce levan-capped silver nanoparticles of about 30 nm (with a loading of 30%) that showed bactericide effect, for *E. coli* and *B. subtilis*. That effect was mathematically studied with a dose-response model (lethal dose of 12.4 ppm and 6.8 ppm respectively). These silver nanoparticles were subsequently introduced in a gel to create a silver release system with bacteria inhibition activity. Silver release from the gel and its bactericidal activity was theoretically studied to develop a unique model that is able to predict accurately both silver release and lethal dose for any type of bacteria. This model will be useful for performing predictions for future silver in gel applications.

**Keywords:** silver; nanoparticles; levan; modelling

## 1. Introduction

Silver nanoparticles antibacterial properties and the problems concerning its proper release have already been known for decades. Due to this fact, silver controlled release systems, such as liposomes or hydrogels, can be considered as potential formulations for biomedical uses, such as wound dressing [1].

Several techniques have been used for obtaining silver nanoparticles, such as metal salt reduction with organic compounds or with polyoxometalates [2–4]. Nevertheless, the use of organic compounds can be environmentally toxic as well as providing biological risks and as a consequence, green techniques have been developed to overcome these limitations. One of the main processes involves the use of biopolymers and/or polysaccharides. As an example, starch [5], chitosan [6], or sucrose can be useful as reducing agents [7].

Among this type of polymers, levan is a fructose homopolysaccharide with proper properties for biomedical applications [8–12]. Levan is obtained by cultivating a bacterial strain (*Zymomonas mobilis* or *Bacillus subtilis* for instance) under acidic conditions (pH between 5–6) and high sucrose concentrations. Under these experimental conditions, the microbial strain releases an enzyme, levansucrase, which breaks the bond glucose-fructose and polymerizes subsequently the fructose to obtain the polymer [8].

Levan has been able to act as a reducing and capping agent for gold and silver salt solutions to obtain the respective polymer-capped nanoparticles [13]. However, to the best of our knowledge, the only work that used levan has been focused on the nanoparticles effect as catalyst and did not study the bactericidal effect of the silver nanoparticles, without a quantification of the amount of silver included in the levan nanoparticles [13]. That fact is important concerning biomedical applications

because silver can be toxic for the human body and its exact amount in the pharmaceutical formulation, nanoparticles in this case, must be known. Previous article also indicated metal nanoparticles size with TEM (Transmission electron microscopy) images but particle size distribution was not deeply studied.

Silver, as it was mentioned before, must be included in a drug release system to be used in a proper way. Silver nanoparticles have been included in liposomes (about 20 nm) [14], in phospholipids to enhance nanoparticles cytotoxicity against cancer cells [15] or in an antimicrobial glass [16,17]. Also it is possible to include silver nanoparticles in a gel formulation, which shows great potential for wound dressing applications [18]. Specifically, alginate is one of the main polymers that have been used for that purpose because the polymer can promote tissue formation and healing [19].

Some authors have proposed the inclusion of silver nanoparticles into an alginate gel. Rescignano et al. [18] prepared a nanocomposite hydrogel alginate-silver and they evaluated their rheological and bactericidal properties with two Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Their results indicated that this system can be useful for inhibiting bacteria growth as well as highlighting the experimental conditions to obtain the highest elastic modulus. Obradovic et al. [20], incorporated silver into discs of a polymeric mixture alginate/PVA. They studied the mechanical properties of the systems and the bactericidal effect with *E. coli*, obtaining positive results.

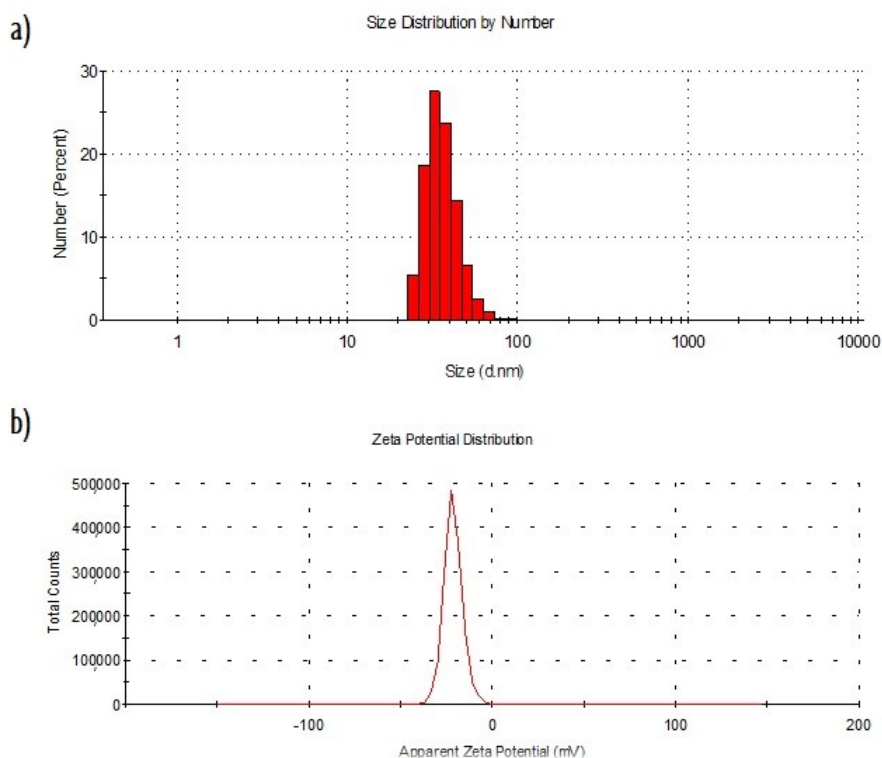
However, the whole drug delivery system, combining silver release and silver bactericidal effect, has not been studied yet. It is possible to find in literature some papers concerning the mathematical analysis of the silver dose for achieving a bacteriostatic effect [21], or focused on silver release modelling from alginate hydrogels [22]. Those works did not study both phenomena simultaneously and thus cannot provide a global model for predicting the effect of silver nanoparticles on bacteria after its release from an alginate hydrogel.

Based on the previous considerations, the main objectives of our work are the following: The first one is to prepare and to characterize levan-capped nanoparticles with its bactericidal evaluation for both Gram positive and Gram negative bacteria. The second one is to include these nanoparticles in an alginate gel to create a drug delivery system that will be studied mathematically by combining silver release and silver dose for bactericidal effect. The developed mathematical model will be helpful to reproduce phenomena that can be important regarding silver-in-gel further applications, such as wound dressing.

## 2. Results

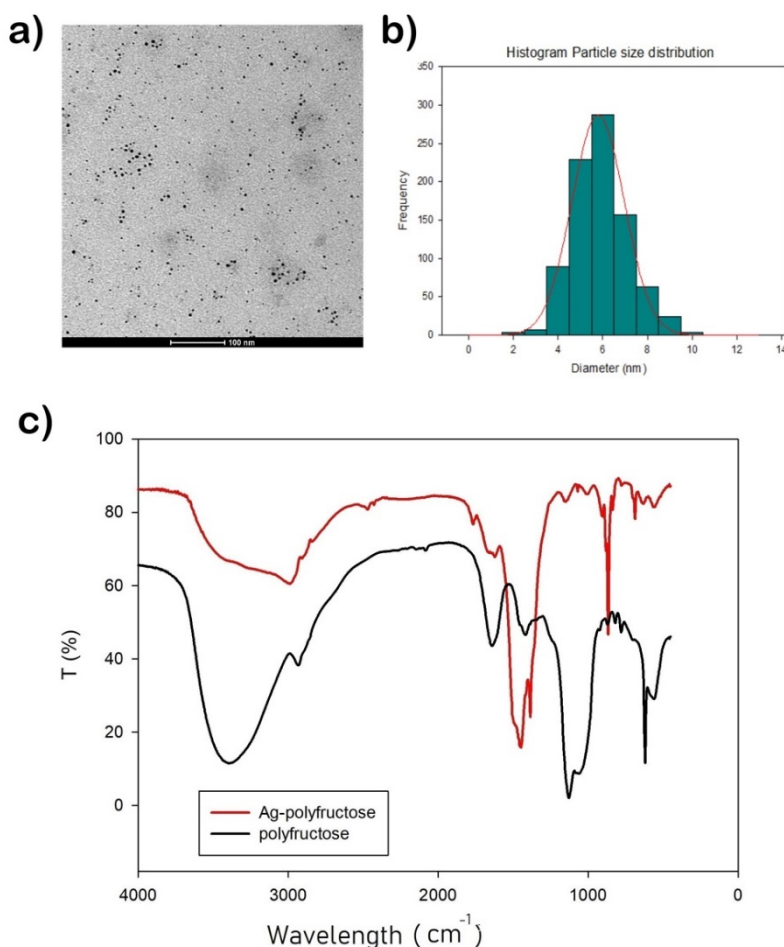
### 2.1. Characterization of Nanoparticles Obtained

By following the protocol described in Section 3.1, AgLeNPs were obtained and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), TEM, UV-visible and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Results are illustrated for an initial silver concentration of 125 ppm. Figure 1 illustrates the particle size distribution (a) and the Zeta potential distribution (b) of the levan-capped silver nanoparticles.



**Figure 1.** Characterization of the AgLeNPs. (a) particle size distribution determined by DLS. (b) Zeta potential distribution determined by DLS.

An average nanoparticle size of  $36.9 \pm 11.8$  nm was obtained. Besides, nanoparticles show a significant negative surface charge ( $-22.3 \pm 5.8$  mV) which prevents particle aggregation phenomena due to repulsive forces and therefore, it suggests a proper nanoparticles stability. Particles have negative charge because silver ions lose their charge because of the reduction reaction with polymer. This value is in accordance with others presented before (range from  $-20$  to  $-25$  mV) [23,24]. Figure 2a shows TEM image of AgLeNPs where their sphericity and their monodispersion are observed. TEM image shows particles of about 6 nm, that is a smaller size in comparison with the Particle Size Distribution (PSD) from dynamic light scattering (results from ImageJ analysis are given in Figure 2b). That size reduction is attributed to the dehydration process for microscope size preparation, as was indicated in Reference [25]. Another phenomenon to explain this size reduction is that TEM cannot detect the polymer layers but can indicate the silver cores. Our nanoparticles size and shape are similar to the obtained nanoparticles in Reference [13]. Figure 2c shows the infrared spectrum of the levan (black) and the levan-capped silver nanoparticles (red). Levan spectrum matches with the typical spectrum for this polymer [26]. When silver is added, fingerprint peaks ( $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ) that correspond to stretching vibration of C–OH and C–O–C bonds are modified. That fact can indicate a possible interaction polymer-silver.



**Figure 2.** (a) Transmission electron microscopy (TEM) image of the nanoparticles synthesized. (b) Histogram of particle size distribution measured by Image J. (c) Fourier transform infrared (FT-IR\_ spectra for AgLeNPs (red) and its comparison with only polyfructose chains (black).

UV-visible experiment (Figure 3) shows a peak in common (silver nanoparticles and polymer alone) around 290 nm and another peak (less intense), around 350 nm. That peak is slightly lower than the surface plasmon resonance at 400 nm because nanoparticles size and the refractive index (medium with NaOH and levan) of the system can modify the position of the surface plasmon resonance peak [27]. On the other hand, it is possible to observe that there is no absorption peak for the polymer alone at that wavelength. This figure shows that these nanoparticles are formed by a polymer-silver.

The amount of silver into the nanoparticles was estimated by measuring the supernatant by ICP-MS, obtaining as a result a concentration of about  $7.1 \pm 2$  ppm. Considering the initial concentration of silver in the reaction (125 ppm), the entrapment yield was  $94.3 \pm 1.6\%$ . After that, nanoparticles were washed by using distilled water and centrifuged again to remove the silver ions non-specifically adsorbed. The supernatant was measured again by ICP-MS and the concentration was 1.3 ppm which is in the range of the standard deviations. Therefore, the non-specific adsorption of silver ions could be considered as negligible. Loading was calculated as the mass of silver per mass of levan. Considering the concentration of levan (400 ppm), the loading capacity takes a value of 29% (mass silver/mass levan).

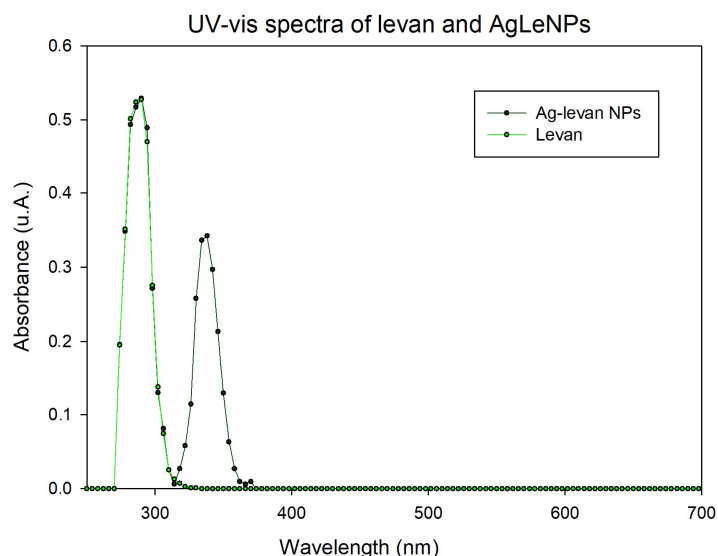


Figure 3. UV-vis spectra of levan and AgLeNPs.

## 2.2. Bacteria Survival

Firstly, it was determined the effect of AgLeNPs, previously to be included in the gel formulation and the results were used to determine the parameters  $n$  and  $D_0$  in the model proposed (Equation (10), single hit-multiple target model). Figure 4 represents the percentage of survival (related to control) at different doses of silver in nanoparticles by measuring the increase in absorbance after 24 h' culture. It is important to specify that the silver dose in the figure (x-axis) corresponds to the amount of silver in the solution that was added inside the AgLeNPs.

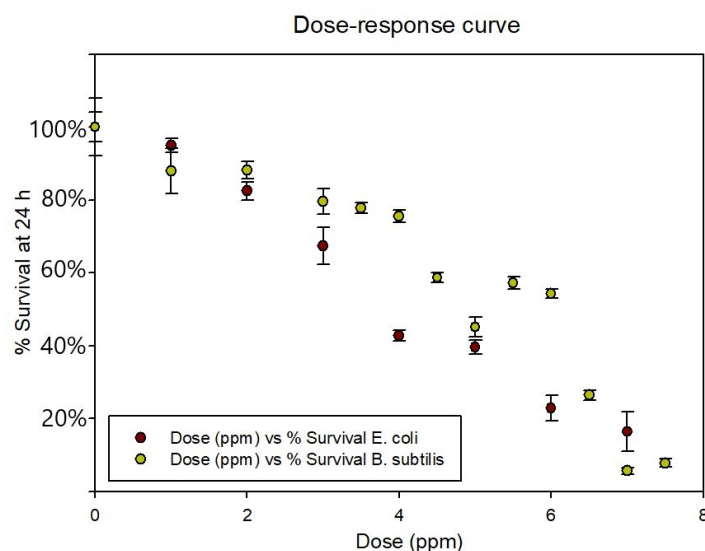


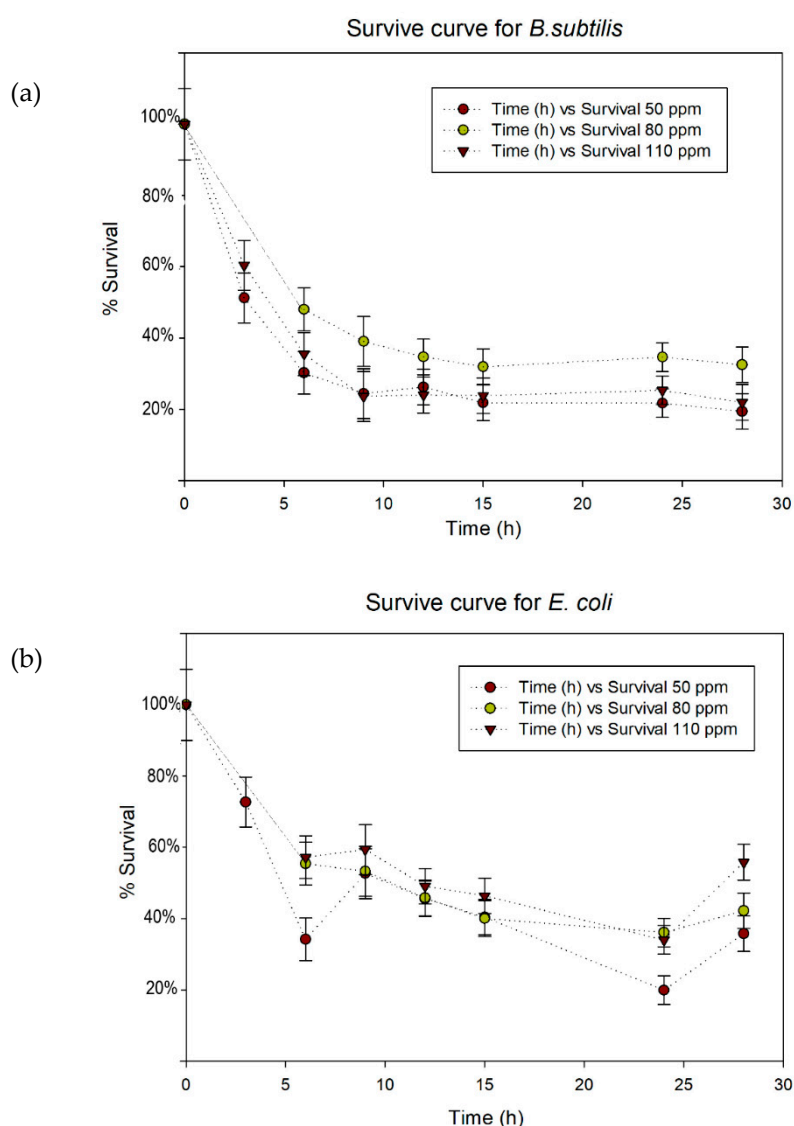
Figure 4. Dose- response curve for *E. coli* and *B. subtilis* with AgLeNps.

The survival curves from Figure 4 suggest more effectiveness in stopping bacterial growth in gram-negative than gram-positive bacteria. This difference agrees with the results from [28,29]. The effect on Gram negative bacteria is more intense because it can be associated with the penetration of the colloid into the cytoplasm, with the subsequent local interaction of silver with cell components causing damages to the cells. However, on Gram positive bacteria the thick peptidoglycan layer of the cell wall prevents the penetration of the NPs inside the cytoplasm and therefore, the antimicrobial effect is limited and seems related to the interaction with the bacterial surface. The dose used for

inhibit bacteria growth (Minimum inhibitory concentration) is smaller than other (13 ppm) doses previously reported for *E. coli* [30]. Significant differences between the results for the different bacteria were highlighted after performing the Wilcoxon Test (See Supplementary Material).

From Figure 4 and with equation 1 linearization, it is possible to calculate the parameters related with bacterial survival. The fitting results show similar values for the number of targets ( $n$ ): 1.904 for *B. subtilis* and 1.868 for *E. coli*. However, the differences in action mechanism are explained by the different lethal doses ( $D_0$ ) calculated: 12.6 ppm for *B. subtilis* and 6.8 ppm for *E. coli*. (See Supplementary Material for survival curves fitting).

Secondly, it was studied the system with silver nanoparticles embedded in an alginate gel. Three different concentrations of silver in the gel (50, 80, 110 ppm) were assayed and the evolution of bacterial survival at different times is showed in Figure 5, where the first graph represents the evolution for *B. subtilis* and the second graph the evolution for *E. coli*.



**Figure 5.** Survival curves for *B. subtilis* (a) and *E. coli* (b).

In order to analyse if silver is released as nanoparticles or as ions, DLS measurements were performed to the medium culture previous to adding the gel and after 20 hours of culture. The results obtained showed the same particle distribution size (around 35 nm) as the one reported in Figure 1a and an increase in the intensity (proportional to the nanoparticle concentration) from  $61.5 \pm 4.1$  kcps to  $139.6 \pm 5.8$  kcps. This increase highlights the existence of light scattering that is explained by the release of nanoparticles from the gel.

The statistical analysis of Survivals curves (Wilcoxon test) showed that there were not significant differences between the concentrations examined (see Supplementary material). That fact indicates that there are not differences in AgNPs concentration in the well. Therefore, the process is only controlled by the release from the gel and doses around 5 ppm (dilution 1:10 of gel concentration 50 ppm) are enough to stop the bacterial growth in both strains, with a survival percentage below 40%.

### 2.3. Parameters Estimated

Parameters  $k$  and  $n$  were estimated for the experiments in Figure 5a,b. Therefore, 6 independent experiments, with two different strains were used to fit the model to the experimental data. Table 1 shows the value of these two parameters for each experiment, the time for estimation, the number of iterations needed, the weighted residuals and the chi-square value. The parameters  $k$  and  $n$  (combined) represents the rate for release.  $K$  is a constant that involves the structural characteristics of the gel, whereas  $n$  is the indicator of release mechanisms. If  $p = 1$ , the release follows a zero-order kinetics; if  $p < 0.5$  (our study-case), the release is controlled by Fickian diffusion [22].

**Table 1.** Parameters estimated and statistical measurements.

Strain	AgLeNPs Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	$k$ ( $\text{s}^{-n}$ )	$p$	Weight Residuals	$\chi^2$	Number of NLP Iterations	Time for Estimation (s)
<i>E. coli</i>	50	0.135	0.266	7.99	11.07	57	17
	80	0.205	0.181	6.99	9.49	64	21
	110	0.328	0.116	3.11	11.10	36	10
<i>B. subtilis</i>	50	0.715	0.203	0.82	12.59	20	7
	80	0.900	0.129	0.51	11.07	27	8
	110	0.156	0.262	2.25	12.56	27	8

Results of parameter estimation showed that in all cases weighted residuals are smaller than chi-square values, which indicates a good fit for the experimental data. The number of iterations and the time for parameter estimation indicates that the model is well-posed. From parameters estimated,  $p$  is assumed to have a value from 0.11 to 0.26 for all systems. For parameter  $k$ , four estimations showed values around 0.2 whereas two of them calculated higher values (around 0.8). Despite these differences, model can fit for all experimental data if an average value of  $k$  and  $p$  is applied (0.206 for  $k$  and 0.193 for  $n$ ). The average standard error was around 9%.

Figure 6 represents the fitting (performed by gPROMS) for the experiments of survival in *B. subtilis* and Figure 7 in *E. coli*. In both cases, the experimental data and the variance set by the simulation are represented in blue and the fitting curve predicted is represented in red.



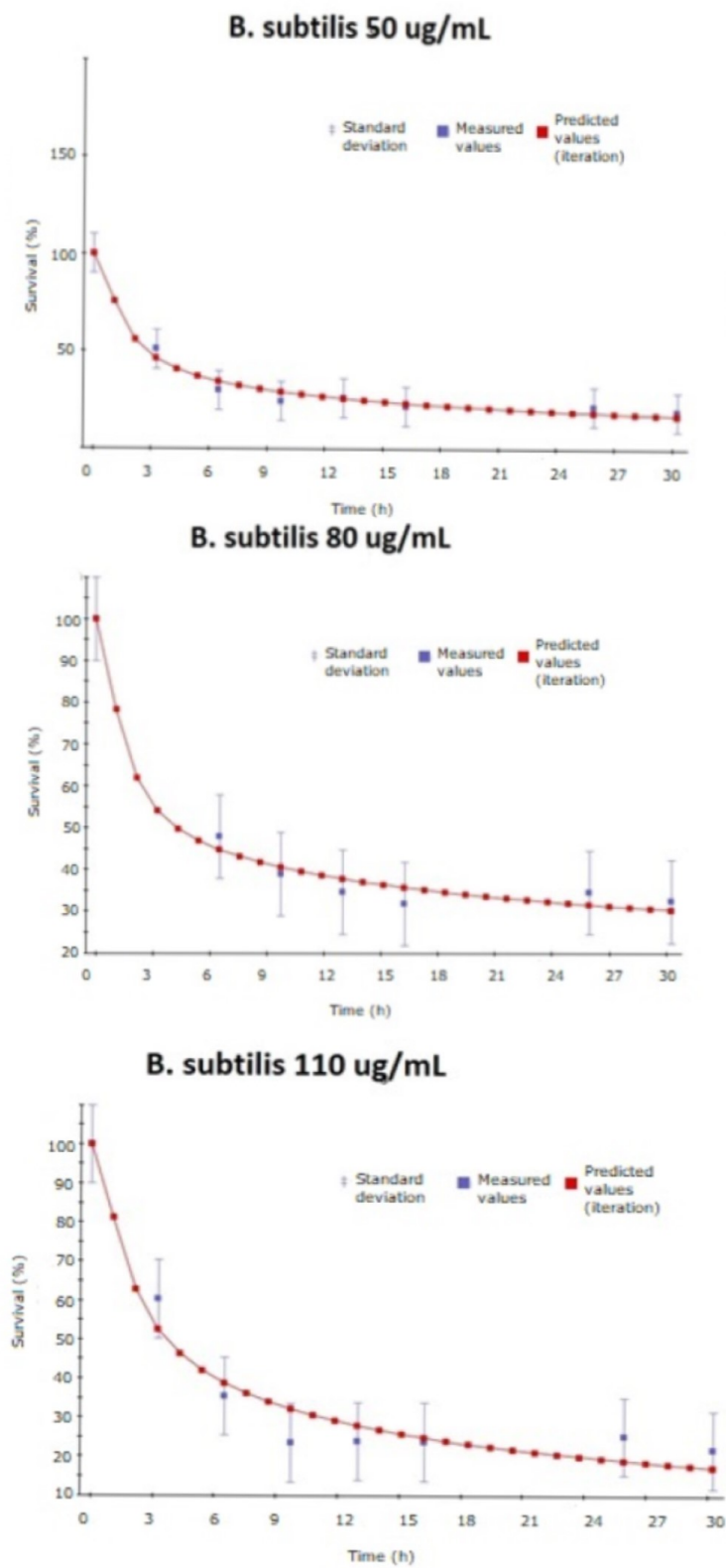
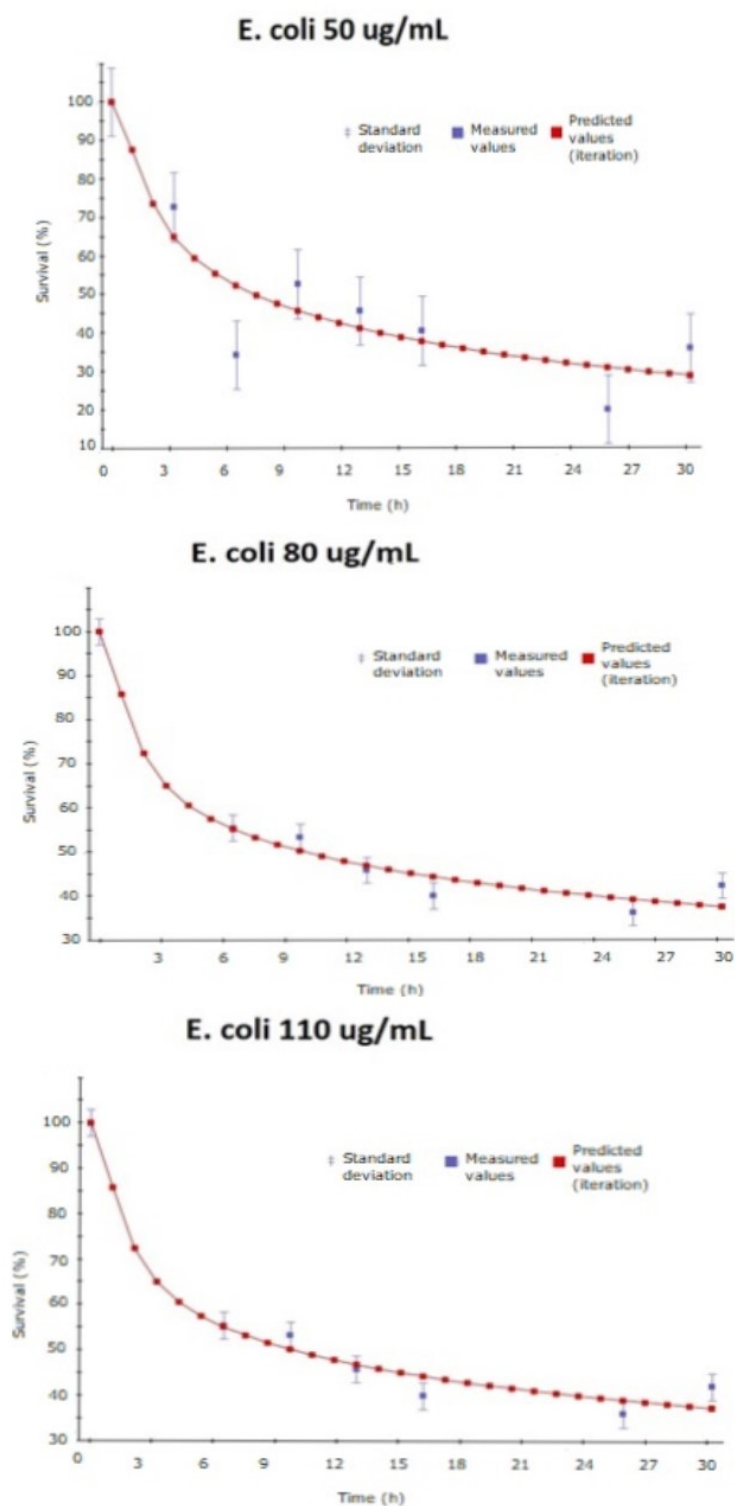


Figure 6. Experimental data and model prediction fitting for *B. subtilis*.





**Figure 7.** Experimental data and model prediction fitting for *E. coli*.

#### 2.4. Simulations from Model

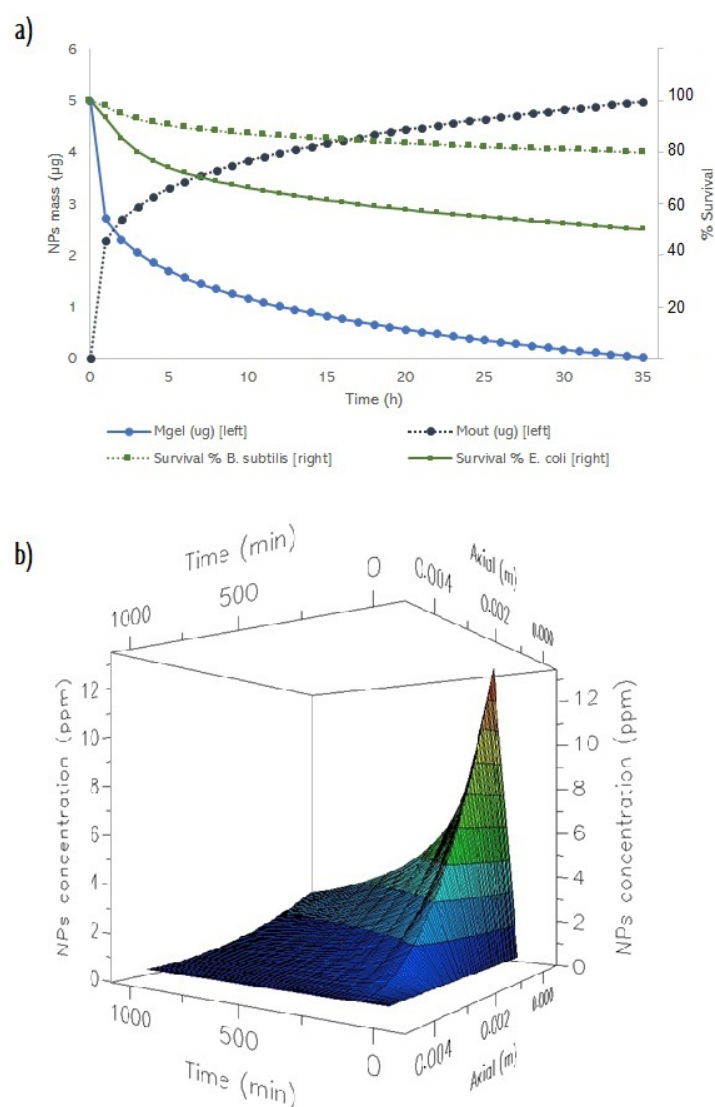
With the average value for  $k$  and  $n$ , more simulations were carried out in gPROMS in order to know the behaviour of other variables considered in the model. Table 2 represents the values of the parameters used for simulations and its reference or calculation.

**Table 2.** Parameters used for simulations.

Parameter	Value	Unit	Reference/Source
dp	0.017	m	Measurement (microwell plate)
Dif	$1.23 \times 10^{-11}$	$\text{m}^2/\text{s}$	Calculated from Stokes-Einstein equation
a <sub>1</sub>	$3 \times 10^6$	$\text{m}^{-1}$	Calculated from gel geometry
a <sub>2</sub>	$2.27 \times 10^3$	$\text{m}^{-1}$	Calculated from bacteria diameter
S <sub>ag</sub>	15.7	$\text{s}^{-1}$	Set experimental (150 rpm)
$\rho_{\text{liq}}$	1000	$\text{kg}/\text{m}^3$	Tabulated value for water
$\rho_{\text{gel}}$	1064	$\text{kg}/\text{m}^3$	Determined experimentally
V <sub>gel</sub>	0.1	mL	Set experimental
V <sub>well</sub>	0.9	mL	Set experimental
$\mu$	0.001	$\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$	Tabulated value for water
T	298	K	Set experimental
r <sub>H</sub>	36	nm	Determined experimentally (DLS)
k <sub>b</sub>	$1.38 \times 10^{-23}$	J/K	Constant
<b>Initial Conditions</b>			
C <sub>broth</sub>	0	$\mu\text{g}/\text{mL}$	
C <sub>s</sub>	0	$\mu\text{g}/\text{mL}$	
M <sub>out</sub>	0	$\mu\text{g}$	

Finally, Figure 8 shows the performed simulations for a concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the gel, using *B. subtilis* and *E. coli*. In the right axis is represented the mass of particles released (blue circles–straight line) and the mass of particles remained (blue circles–dashed line) in the gel and left axis represents the survival percentage for each strain (green square–straight line for *B. subtilis* and green squares–dashed line for *E. coli*). The model is able to predict accurately the release profile. However, significant differences were obtained for the survival rate of *B. subtilis*. In spite of that fact, the model can predict survival tendency, given as a result a higher *B. subtilis* survival than the *E. coli* survival. This phenomenon agrees with the experimental data. In this context, it is important to specify that these simulations (Section 2.4) were carried out with an average value for k and p (obtained in Section 2.3) in order to get a global model for any strain. That is the reason why survival prediction was not accurate for *B. subtilis*. Values for k and p should be used from Table 1 for every condition if a more precise simulation must be done.

Finally, Figure 8b represents the evolution of NPs concentration (z-axis) along the gel (y-axis) at different times (x-axis). This 3D graph represents how diffusion controls the movement of nanoparticles inside the gel and how release is controlled by this process, creating a gradient of concentration (axial dispersion). These simulations can be used in further studies in order to optimize the release of silver nanoparticles from a gel for topical administration.



**Figure 8.** (a) Profiles obtained by simulations from the model. Evolution of nanoparticle (NPs) mass inside the gel and outside and the evolution of survival percentage for 35 hours in *B. subtilis* and *E. coli*. (b) evolution of nanoparticles concentration inside gel depending on time and position.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Nanoparticle Synthesis and Characterization

Levan was synthesized in a cell-free system by using the enzyme Fructosyl-transferase from *Bacillus subtilis* (S168), purchased from Creative Enzymes. The reaction was carried out in a batch stirred tank reactor (volume 100 mL) at 150 rpm and 37 °C (thermostatically controlled) for 24 h by using 90 g/L sucrose as substrate (Sigma Aldrich) and 0.2 ppm enzyme (as catalyst). In order to precipitate the polymer, ethanol 96% (VWR Chemicals) was added to reaction medium in a proportion 3:1 (volume:volume) and calcium chloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA up to a concentration 1 mM. The mixture was kept at −20 °C for 24 h to provoke the polymer precipitation. After that, supernatant was discarded by centrifugation at 10.000 rpm for 10 min. The precipitate was dried by lyophilization at 0.050 mbar and −55 °C (Telstar, Spain).

Levan-capped silver nanoparticles were produced by dissolving 20 mg of the obtained levan in 49 mL of basic water solution (NaOH 0.2% *w/w*). Then, 1 mL of a solution AgNO<sub>3</sub> (1 mM), previously prepared, was added to the polymeric solution. The new mixture was stirred at 200 rpm during

10 min at 25 °C for silver nanoparticles formation. This methodology was used in Reference [13]. Nanoparticles were subsequently separated from the non-reactant medium by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. Finally, levan-silver nanoparticles (AgLeNP) in the pellet were dried by lyophilization (0.050 mbar and −55 °C) for further characterization experiments.

In order to characterize the polymer capped silver nanoparticles, Fourier-transform infrared spectrum were carried out by using a Perkin-Elmer Spectra One Instrument. Potassium bromide (KBr) pellets were used and 32 spectra were recorded with a nominal resolution of 4 cm<sup>−1</sup>.

Surface-plasmon-resonance effect was determined by using a UV visible equipment, (UV-1800, Shimadzu).

Nanoparticles were resuspended in phosphate buffer saline (PBS) for particle size distribution and surface-charge (Zeta potential) measurements. Both analyses were performed by Dynamic Light Scattering using Malvern ZS Nano as equipment.

Nanoparticles shape and morphology were studied by Transmission Electron Microscopy (TEM) in a Zeiss EM902 at 80 kV after loading a droplet of the suspension on a grid with a subsequent drying process with air.

TEM image analysis was performed with ImageJ. A threshold modelling (white/black) was carried out previous the particle counting and then results were processed with Mathematica to avoid noise problems.

### 3.2. Silver Determination in the Polymer-Capped Nanoparticles

The amount of silver in the nanoparticles was determined by difference after analysing the mass of silver in the supernatant after the centrifugation step. Silver was quantified by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) using an instrument model 7800 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The mass used for silver was 107 with Radiofrequency Power 1500 Watts and the pump operating at 0.10 rps. The flow rates for gases are the following: 15.0 L/min (plasma gas), 0.90 L/min (auxiliary gas), 0.99 L/min (nebulization gas). For equipment calibration, different concentrations (from 0.2 to 10 ppm) were prepared from a Certificate standard solution of silver (concentration: 1000 mg/L).

### 3.3. Gel Formation

Silver-polymer nanoparticles were included in an alginate solution (2% *w/w*) in order to study the behaviour of particles inside a drug delivery system formulation. Different concentrations of nanoparticles were included in the gels in order to study the effect of the concentration in its release and its bacteriostatic effect. Alginate solution containing AgLeNPs was reticulated by adding 60 µL calcium chloride (2% *w/w*) per each millilitre of alginate solution. The gelation process is instantaneous [31].

### 3.4. Bacteria Survival Assays

Two strains were selected to study the bacteriostatic effect of the AgLeNPs obtained. *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) was selected as example of Gram-positive bacteria and *Escherichia coli* (strain K12) as Gram-negative. Both bacteria were cultured in Agar-Nutritive plates to obtained isolated colonies at 30 °C. Then, one colony of each bacterium was suspended in liquid medium agar-nutritive to proliferate for 6 hours before performing the survival assay. After these six hours, optical density (O.D.) was measured by spectrophotometry at 600 nm and the appropriate dilution was carried out in order to get the bacteria for seeding at 0.1 O.D.

Firstly, survival assays were performed with free AgLeNPs in the medium. This assay was carried out in 24-microwell plates, where the proportion of solutions added to each well (1 mL final volume) is the following: 100 µL solution of AgLeNPs at different concentrations, 100 µL solution of bacteria at 0.1 O.D., 800 µL culture medium. Two different controls were used: one control with bacteria without nanoparticles and another control with culture medium without bacteria. Each concentration was studied by triplicate. Absorbance at 600 nm was measured at time 0 and 24 h by using Microplate

Reader: EZ Read 2000 (Biochrom, Cambridge, UK) and the survival percentage for each concentration was calculated by using the control value (without nanoparticles and a survival value of 100%) as a reference.

Secondly, the experiments were carried out by adding 100  $\mu$ L alginate solution containing AgLeNPs (at different concentrations) at the bottom of each well and the subsequent addition of calcium chloride to gel formation. Bacteria were added at 0.1 O.D. and culture medium up to final volume 1 mL in each well. Absorbance at 600 nm was measured at time 0, 3, 6, 9, 12, 15, 24 and 28 h for study the release from gel and its effect on both bacteria strains. Microwell plates were kept at 35 °C and 150 rpm in orbital shaker. Each concentration and time was studied by triplicate.

In both cases, Wilcoxon Signed Rank Test was used to determine if survival curves and dose-response curves are significantly different. Statistical method was carried out following the description showed by F. Wilcoxon [32]. According to Wilcoxon Test tables, critical value for seven trials (seven different times or doses measured) is 3, for a significance level of 0.05. Therefore, results will be significant between both curves (data serial) if the obtained value is smaller (or equal) than 3 (in absolute value).

Moreover, in order to check that silver is released as nanoparticles and not as ions, the intensity and the size of particles in the medium (previous and after including them inside the gel) was measured by DLS. With both values is possible to analyse in which form silver is released because light scattering intensity is directly proportional to nanoparticle concentration.

### 3.5. Model Formulation

The model try to explain the behaviour of nanoparticles inside the gel, nanoparticles release from gel to liquid medium in the well and its toxicity effect on bacteria (survival reduction). The model was implemented in *gPROMS* 5.0.2 (PSE), containing 115 total equations (111 algebraic, 4 differential). For studying axial dispersion, gel was discretized on axial (*z*) in 100 beans. No discretization method was used for culture medium because mixing conditions guarantees no effects of concentration gradient in the liquid part of the system. The model takes 3 s to run in a personal computer Intel Core I3 3.70 GHz and 4 GB RAM memory. Figure 9 shows the dimension of the silver-gel and the steps to build the model, its validation and the parameter estimation of the release from the survival data.

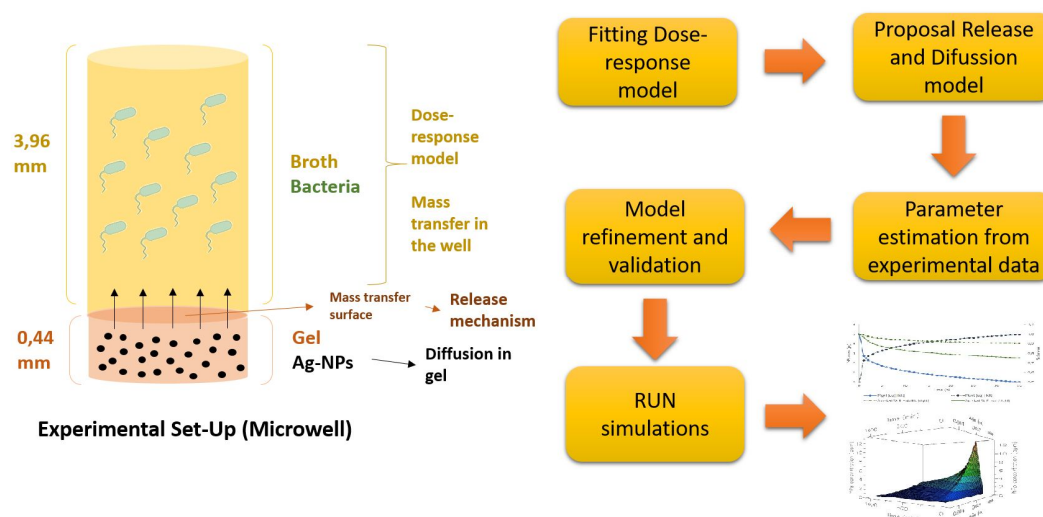


Figure 9. Experimental set-up and steps of modelling.

#### 3.5.1. Nanoparticles Effect on Bacteria, Survival Modelling

Firstly, the effect of AgLeNPs on bacteria was modelled by using the results obtained with free dispersed particles in culture medium. Three different models for explaining the dose-response were

studied: single-hit/single-target; multiple-hit/single-target; single-hit/multiple-target [33]. After fitting the experimental data to these models, best results were obtained with a single-hit/multi-target model, that explains the survival percentage depending on concentration or dose (Equation (1)). Fitting results and constant determination ( $D_0$  and  $n$ ) can be seen in Supplementary Material.

$$S = 1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}}\right)^n \quad (1)$$

The following assumptions were considered:

- Each cell has  $n$  targets
- Each target is inactivated by one nanoparticle
- The inactivation of 1 target is considered as “sub-lethal” event.
- All targets should be inactivated to kill the cell

In the heterogeneous system (gel and the liquid culture medium), the concentration in bacteria's surface ( $C_s$ ) was considered as  $D$  (dose) for survival prediction because that dose will reach the gel surface and will be taken up by the microorganisms.

### 3.5.2. Mass Transfer of Nanoparticles in Gel

At the beginning of the experiment, after gel preparation, nanoparticles are distributed homogeneously. However, axial dispersion phenomenon occurs subsequently due to the nanoparticles release (the release surface is the upper part of the gel) to the liquid medium. The number of particles released is related to the number of particles available for release in the interface, which is controlled by Fick diffusion (Equations (2) and (3)):

$$\frac{N_{NPs}}{A} = -D_{ef} \frac{dC_{NPs}}{dz} \quad (2)$$

$$\frac{dN_{NPs}}{dz} + \rho_{gel} \cdot \pi \cdot r_w^2 \cdot v_r = 0 \quad (3)$$

where  $v_r$  is the velocity for the release and it is defined as the variation in concentration inside the gel with respect to time (Equation (4))

$$v_r = -\frac{dC_{in}}{dt} \quad (4)$$

By substituting Equation (1) in Equation (2), it is obtained the final expression that explains the concentration gradient through the gel (Equation (5)).

$$\pi \cdot r_w^2 \cdot \left( \rho_{gel} \cdot v_r - D_{ef} \cdot \frac{d^2 C_{NPs}}{dz^2} \right) = 0 \quad (5)$$

The velocity of release can be estimated by following the Korsmeyer-Peppas model (Equation (6)) [34].

$$\frac{dM_{out}}{dt} = M_{tot} \cdot k \cdot t^{p-1} \quad (6)$$

where mass balance follows Equation (7),

$$M_{in} + M_{out} = M_{tot} \quad (7)$$

Parameters  $k$  and  $p$  from Equation (6) are responsible of the release velocity and they will be estimated by parameter estimation (Section 3.3). As was mentioned before, silver release was estimated by bacteria survival (see Section 3.3).

$C_{in}$  can be calculated by knowing  $M_{in}$  and the gel volume (100  $\mu$ L), Therefore, velocity of release is calculated with Equation (4).



### 3.5.3. Mass transfer of Nanoparticles in Liquid Culture Medium

The behaviour of AgLeNPs in culture medium can be explained by using a correlation with dimensionless numbers, proposed by Doig et al. [35] for microwell plates (Equation (8)).

$$Sh = 0.19 \cdot Re^{0.68} \cdot Sc^{0.36} \quad (8)$$

From Sherwood number (Sh), it is possible to determine the coefficient for mass transport in the liquid (Ks). Moreover, in order to perform an appropriate calculation of Sh and Sc number, the diffusion coefficient (Dif) for nanoparticles was calculated by using the Stokes-Einstein equation, taking the value from the DLS measurement as the hydrodynamic radius (Equation (9)).

$$Dif = \frac{k_b \cdot T}{6\pi \cdot \mu \cdot r_H} \quad (9)$$

The time-dependent concentration of nanoparticles in the broth can be estimated as the difference between the number of particles released from gel and the number of particles internalized by cells (Equation (10)). Both equations are controlled by a mass transfer coefficient ( $K_s a_x$ ) where  $a$  depends on the geometry which is different for gel release (planar surface of a cylinder) and bacteria uptake (spherical)

$$\frac{dC_{broth}}{dt} = K_{Ia1} \cdot (C_{int} - C_{broth}) - K_{Ia2} \cdot (C_{broth} - C_s) \quad (10)$$

The concentration in the interface ( $C_{int}$ ) can be estimated as the ratio among the mass of AgLeNPs release and a differential volume (discretization method). The concentration in the surface of bacteria ( $C_s$ ) will be considered as the dose (D) for bacteria uptake because it is the real available concentration for this phenomenon.

### 3.6. Parameter Estimation

Parameter estimation was carried out in gPROMS 5.0.2 (PSE), by using the survival experimental data. The variance model selected was constant and the sensor for parameter estimation was fixed as a function of the variable survival (S), in a range from  $10^{-5}$  to 0.1. Two parameters (from release kinetics) were estimated:  $k$  and  $n$ . Boundary conditions were set for each parameter estimation process. Iterations for  $k$  determination were in the range from 0 to 0.9; and iterations for  $n$  determination were in the range from 0 to 1.

For statistical analysis, weighted residuals were calculated and compared with chi-square value ( $\chi^2$ ) for a confidence interval of 95%. It is generally assumed that model effectively predicts the experimental data when weighted residuals are less than chi-square value. For cases where weighted residuals are greater than chi-square, the model may need some changes to better describe the experimental data [36].

## 4. Conclusions

Silver-coated nanoparticles with bactericidal effect were synthesized by using a green technique with a fructose polymer (levan). A loading capacity of 29% was obtained while producing spherical nanoparticles with a size of about 35 nm. These levan-silver capped nanoparticles showed a bactericidal effect with both Gram-negative or Gram-positive bacteria, although a less effectiveness was found for Gram-positive due to the peptidoglycan wall. Moreover, it was found that bacterial survival followed a single-hit/multiple-target model (dose-response behaviour) with a silver lethal dose of 12.6 ppm for *B. subtilis* and of 6.8 ppm for *E. coli*.

Polymer-silver nanoparticles were also introduced in an alginate gel to produce a further silver delivery system that can be useful for different applications. The gel was able to reduce the bacterial survival up to 20% in 5–10 h depending on the bacteria genera. Based on dispersion axial phenomenon, silver release and nanoparticles diffusion to combine nanoparticles silver release from inside the gel to

its “killing” effect, a model was successfully developed to predict both silver release and lethal dose for different bacteria type. This general model was able to predict accurately silver release and the tendency of the bactericidal effect for Gram positive and Gram negative bacteria (adjustable parameters are required to get an exact bactericidal effect). However, this model provides a complete knowledge for the potential use of a silver-gel for wound dressing applications.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1502/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, Á.D. and E.M.d.V.; Methodology, M.H., Á.G.-G. and R.M.; Software, Á.G.-G.; Formal Analysis, M.H. and R.M.; Data Curation, R.M., A.T., M.H. and Á.G.-G.; Writing—Original Draft Preparation, Á.G.-G. and A.T.; Writing—Review & Editing, A.T. and Á.D.; Supervision, E.M.d.V.; Project Administration, E.M.d.V.; Funding Acquisition, E.M.d.V.

**Funding:** This research was funded by Spanish Ministry of Science (project grant: CTQ2016-78988-R).

**Acknowledgments:** Authors want to acknowledge the financial support for research from Spanish Ministry of Science (project grant: CTQ2016-78988-R). Álvaro González-Garcinuño also acknowledges Spanish Ministry of Education for his PhD. Fellowship (FPU14/04914).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## Abbreviations

A	Area for NPs release ( $m^2$ ), $\pi \cdot r_w^2$
$a_1$	Specific area for mass transfer gel to liquid ( $m^2/m^3$ )
$a_2$	Specific area for mass transfer liquid to bacteria surface ( $m^2/m^3$ )
$C_{broth}$	Concentration of NPs in culture broth (mg/mL)
$C_{in}$	Average concentration of NPs inside gel (mg/mL)
$C_{int}$	Concentration of NPs in the interface liquid-gel (mg/mL)
$C_{NPS}$	Concentration of NPS (mg/mL)
$C_s$	Concentration of nanoparticles in the surface of bacteria (mg/mL)
D	Silver dose (ppm)
$D_0$	Lethal dose (ppm)
$D_{ef}$	Effective diffusion coefficient in gel ( $m^2/s$ )
Dif	Diffusion coefficient ( $m^2/s$ )
$D_w$	Well diameter (m)
k	Korismeyer-Peppas constant 1 ( $s^{-n}$ )
$K_b$	Boltzmann constant (J/K)
$K_l$	Mass transfer coefficient (m/s)
$M_{in}$	Mass of nanoparticles in gel-solid medium (mg)
$M_{out}$	Mass of nanoparticles in liquid medium (mg)
$M_{tot}$	Total mass of nanoparticles in the well (mg)
n	Number of targets in bacteria
$N_{NPS}$	Number of nanoparticles (mol)
p	Korismeyer-Peppas constant 2
Re	Reynolds number, $\eta/(\rho_{liq} \cdot Dif)$
$r_H$	Hydrodynamic radius of nanoparticles (m)
$r_w$	Well radius (m)
S	Survival percentage (%)
$S_{ag}$	Agitation speed in orbital shaker ( $s^{-1}$ )
$Sc$	Schmidt number, $\rho_{liq} \cdot S_{ag} \cdot d_w^2 / \eta$
Sh	Sherwood number, $d_w \cdot k_l / Dif$
T	Temperature (K)
t	Time (s)
$v_r$	Release velocity (mg/mL·s)
$\mu$	Fluid viscosity (kg/m·s)
$\rho_{gel}$	Gel density ( $kg/m^3$ )
$\rho_{liq}$	Liquid-broth density ( $kg/m^3$ )

## References

1. Hadrup, N.; Sharma, A.K.; Loeschner, K. Toxicity of silver ions, metallic silver and silver nanoparticles materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *98*, 257–267. [\[CrossRef\]](#)
2. Faramarzi, M.A.; Sadigui, A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2013**, *189–190*, 1–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Takkar, K.N.; Mhatre, S.S.; Parikh, R.Y. Biology synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 257–262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Dhayagude, A.C.; Newase, S.K.; Joshi, S.S.; Kapadnis, B.P.; Kapoor, S. Preparation of silver nanoparticles in the presence of polyoxometalates. *Mater Sci. Eng. C* **2019**, *94*, 437–444. [\[CrossRef\]](#)
5. Fanta, G.F.; Kenar, J.A.; Felker, F.C.; Byars, J.A. Preparation of starch-stabilized nanoparticles from amylose-sodium palmitate inclusion complexes. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 260–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Lavorgna, M.; Attianese, I.; Buonocore, G.; Conte, A.; del Nobile, M.; Tescione, F.; Amendola, E. MMT-supported Ag nanoparticles for chitosan nanocomposites: Structural properties and antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 385–392. [\[CrossRef\]](#)

7. Valodkar, M.; Badhoriya, A.; Pohnerkar, J.; Mohan, M.; Thakore, S. Morphology and antibacterial activity of carbohydrate-stabilized silver nanoparticles. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1767–1773. [[CrossRef](#)]
8. González-Garcinuño, A.; Tabernero, A.; Domínguez, A.; Galán, M.A.; del Valle, E.M.M. Levan and levansucroses: Polymer, enzyme, microorganisms and biomedical applications. *Biocatal. Biotransform.* **2017**, *36*, 233–244.
9. Srikanth, R.; Reddy, H.S.S.; Siddartha, G.; Ramaiah, M.J.; Uppuluri, K.B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *120*, 102–114. [[CrossRef](#)]
10. Tabernero, A.; González-Garcinuño, A.; Sánchez-Álvarez, J.M.; Galán, M.A.; del Valle, E.M.M. Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *160*, 26–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Choi, W.I.; Hwang, Y.; Sahu, A.; Min, K.; Sung, D.; Tae, G.; Chang, J.H. An injectable and physical levan-based hydrogel as a dermal filler for soft tissue augmentation. *Biomater. Sci.* **2018**, *10*, 2627–2638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kim, K.H.; Chung, C.B.; Kim, Y.H.; Kim, K.S.; Hang, C.S.; Kim, C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* **2005**, *56*, 395–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ahmed, K.B.A.; Kalla, D.; Uppuluri, K.B.; Anbazhagan, V. Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *112*, 539–545. [[CrossRef](#)]
14. Yusuf, A.; Brophy, A.; Gorey, B.; Casey, A. Liposomal encapsulation of silver nanoparticles enhances cytotoxicity and causes induction of reactive oxygen species-independent apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* **2018**, *38*, 616–627. [[CrossRef](#)]
15. Barani, H.; Montazer, M.; Samadi, N.; Toliyat, T. Nano silver entrapped in phospholipids membrane: Synthesis, characteristics and antibacterial kinetics. *Mol. Membr. Biol.* **2011**, *28*, 206–215. [[CrossRef](#)]
16. Guldiren, D.; Aydin, S. Antimicrobial property of silver, silver-zinc and silver-copper incorporated soda lime glass prepared by ion exchange. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 826–832. [[CrossRef](#)]
17. Vale, A.C.; Pereira, P.R.; Barbosa, A.M.; Torrado, E.; Alves, N.M. Optimization of silver-containing bioglass nanoparticles envisaging biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *94*, 161–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rescignano, N.; Hernández, R.; López, L.D.; Calvillo, I.; Kenny, J.M.; Mijangos, C. Preparation of alginate hydrogels containing silver nanoparticles: a facile approach for antibacterial applications. *Polym. Int.* **2016**, *65*, 921–926. [[CrossRef](#)]
19. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126. [[CrossRef](#)]
20. Obradovic, B.; Stojkowska, J.; Jovanovic, Z.; Miskovic-Stankovic, V. Novel alginate based nanocomposite hydrogels with incorporated silver nanoparticles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 99–107. [[CrossRef](#)]
21. Chatterjee, T.; Chatterjee, B.K.; Majumdar, D.; Chakrabarti, P. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modelling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 299–306. [[CrossRef](#)]
22. Kostic, D.; Vidovic, S.; Obradovic, B. Silver release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels in the presence of chloride ions: experimental results and mathematical modelling. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 76. [[CrossRef](#)]
23. Lawler, D.F.; Mikelonis, A.M.; Kim, I.; Lau, B.T.; Youn, S. Silver nanoparticle removal from drinking water: flocculation/sedimentation or filtration? *Water Supply* **2013**, *13*, 1181–1187. [[CrossRef](#)]
24. Saeb, A.T.M.; Alshammari, A.S.; Al-Brahim, H.; Al-Rubeaan, K.A. Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 704708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. [[CrossRef](#)]
26. Grube, M.; Bekers, M.; Upite, D.; Kaminska, E. Infrared spectra of some fructans. *Spectroscopy* **2002**, *16*, 289–296. [[CrossRef](#)]
27. Rai, V.N.; Srivastava, A.K.; Mukherjee, C.; Deb, S.K. Localized surface plasmon resonance and refractive index sensitivity of vacuum-evaporated nanostructured gold thin films. *Ind. J. Phys.* **2016**, *90*, 107–116. [[CrossRef](#)]

28. Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M.; Uchida, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent. Mater.* **2000**, *16*, 452–455. [[CrossRef](#)]
29. Taglietti, A.; Fernández, Y.A.D.; Amato, E.; Cucca, L.; Dacamo, G.; Grisoli, P.; Necchi, V.; Pallavicini, P.; Pasotti, L.; Patrini, M. Antibacterial Activity of Glutathione-coated Silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative Bacteria. *Langmuir* **2012**, *28*, 8140–8148. [[CrossRef](#)]
30. Panáček, A.; Kvítek, L.; Smékalová, M.; Vecerová, R.; Kolar, M.; Röderová, M.; Dycka, F.; Sebel, M.; Prucek, R.; Tomanec, O.; et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotech.* **2018**, *13*, 65–71. [[CrossRef](#)]
31. Blandino, A.; Macías, M.; Cantero, D. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and  $\text{CaCl}_2$  concentration on gelation kinetics. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 686–689. [[CrossRef](#)]
32. Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometr. Bull.* **1945**, *1*, 80–83. [[CrossRef](#)]
33. Yu, T.; Xiong, Z.; Chen, S.; Tu, G. The use of models in “target” theory to evaluate the survival curves of human ovarian carcinoma cell line exposure to Adriamycin combined with ultrasound. *Ultrason Sonochem.* **2005**, *12*, 345–348. [[CrossRef](#)]
34. Peppas, N.; Narasimhan, B. Mathematical models in drug delivery: how modelling has shaped the way we design new drug delivery systems. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Doig, S.D.; Pickering, S.C.R.; Lye, G.J.; Baganz, F. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 2741–2750. [[CrossRef](#)]
36. *gPROMS Advanced User Guide*; Process System Enterprise, Ltd.: London, UK, 2004; p. 37.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





# Biotechnological strategies to produce levan: Mass transfer and techno-economical evaluation

Álvaro González-Garcinuño, Sonia Ruiz, Álvaro Sánchez-Muñoz, Antonio Tabernero, Eva Martín del Valle\*

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Spain  
Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Levan  
Heterogeneous reactors  
Techno-Economical evaluation  
Nanoparticle characterization  
Levansucrase

## ABSTRACT

Levan is a fructose polysaccharide with potential as a carrier for drug delivery systems due to its ability to form nanoparticles in water by a self-assembly phenomenon. In order to overcome drawbacks concerning its production by fermentative processes (long time for growing bacteria and *downstreaming* and purification steps), different enzymatic processes are studied. Specifically, a packed bed reactor with the enzyme in alginate beads, a monolithic reactor (with the immobilized enzyme) and a homogenous batch stirred tank (without enzyme immobilization) are proposed. The last one is used to determine the kinetics and to compare the efficacy of the heterogeneous reactors. Techno-economical evaluations show that, for packed bed reactor and monolithic reactor, fixed capital costs (around 500,000 €) and production costs are similar (around 6000 €/kg) in spite of the processes differences. Nanoparticles obtained by levan from alginate beads (2 mm) have a size around 230 nm whereas nanoparticles of 150 nm were obtained from the monolithic reactor and from the batch reactor. Finally, mass transfer models for those heterogeneous reactors highlight that monolithic reactor provides a low resistance to mass transport ( $0.031 \text{ s}^{-1}$ ), whereas packed bed reactor increases that resistance ( $0.301 \text{ s}^{-1}$ ) due to tortuosity and internal transport through beads.

## 1. Introduction

Levan is a fructose homopolysaccharide that is produced by some plants (using enzymes of the family GH32) and microorganisms that express the enzyme levansucrase. That enzyme catalyses the sucrose breakdown into glucose and fructose, for the polymerization of fructose by  $\beta(2 \rightarrow 6)$  linking. This biodegradable and biocompatible polymer has some peculiarities, in comparison with other polysaccharides, that have been already described in literature [1]. Its intrinsic viscosity is very low, can produce a water soluble film and has a good heat stability melting (more than  $200^\circ\text{C}$ ) for a bio-based material [2]. Moreover, it has proper properties for cell proliferation, for wound healing and in addition exhibits a moisturizing effect [3,4].

Due to the above mentioned reasons, levan has been included in different formulations to improve cell proliferation and cosmeceutical properties of different materials. As an example, films by using a layer by layer process with chitosan or alginate [5], fibers (electrospinning process) [42] or in temperature sensitive gels (with pNIPAA) [6] by a photocross-linking reaction have already been produced.

In addition, levan also shows a great potential for drug delivery

applications in biomedicine due to its special ability for its rearrangement into nanoparticles by a self-assembly process when it is put in contact with water. This phenomenon has already been exploited to create different drug delivery systems to release different substances such as proteins or drugs [7,8].

Levan has been traditionally obtained from microorganisms, such as *Zymomonas mobilis* or *Bacillus subtilis* [9]. In many cases, this microbial fermentation process should be performed under an acid pH (between 5–6) and high sucrose concentration. These experimental parameters provide an environment in which the enzyme is secreted (from the bacteria wall) to the medium culture, where it breaks the sucrose bond (of the excess of sucrose) and polymerizes the fructose to obtain the polymer [10,11].

Moreover, fermentative production requires further steps for bacteria removal and polymer precipitation, a long initial period of time for the bacteria to grow (previously to the polymer synthesis) as well as the use of different culture medium that increases the production costs [12].

In this context, enzymatic production has been used as an alternative for obtaining levan because it overcomes some of the previous

\* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza los Caídos s/n, Spain.

E-mail address: [emvalle@usal.es](mailto:emvalle@usal.es) (E. Martín del Valle).

## Nomenclature

$C_S$	Sucrose concentration (mM)
$V_{\max}$	maximal velocity ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ ); $V_{\max} = K_{\text{cat}}/[E]$
$K_{\text{cat}}$	catalytic constant ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )
$K_M$	Michaelis-Menten constant (mM)
$t$	time (s)
$D$	mass diffusion coefficient ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ). For fructose: $6.6\cdot 10^{-10}$ ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ).
$Sc$	Schmidt number; $Sc = \mu / (\rho\cdot D)$
$Sh$	Sherwood number; $Sh = (K_f D_p) / D$
$Da$	Damköhler number; for M-M kinetics: $Da = V_{\max} / (K_f\cdot a\cdot K_m)$
$Gz$	Graetz number; $Gz = \frac{Re_{(ch)}\cdot Sc\cdot d_{(ch)}}{L_{ch}}$
$\Phi$	Thiele modulus (dimensionless)
$K_f$	mass transfer coefficient (bulk to particle surface) ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$Re$	Reynolds number; $Re = \frac{d\cdot v\cdot \rho}{\mu}$
$Re$	Reynolds number for particles: $Re_p = \frac{d_p\cdot \rho\cdot v}{\mu}$
$Q$	flow rate ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$A$	Column Area ( $\text{m}^2$ )
$a$	Effective area for transference ( $\text{m}^2$ )
$L$	length (m)
$d$	diameter (m)
$b$	thickness (m)
$K_r$	catalytic constant for first order kinetic ( $\text{s}^{-1}$ )

$R$	particle radio (m)
$r$	distance to the center of the particle (m)
$\Delta P$	pressure drop (MPa)

## Greek letters

$\mu$	kinematic viscosity ( $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\rho$	density ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )
$\tau$	tortuosity (dimensionless)
$\varepsilon$	porosity (dimensionless)
$\eta$	effectiveness factor

## Superscripts and subscripts

w	water
alg	alginate-Ca beds
p	particle
mon	monolith
ch	channel
enz	enzyme
b	bulk
s	surface
i	intern
r	reaction

drawbacks. The direct use of the enzyme provides a fast reaction without requiring a laborious and extensive downstreaming [13]. Enzymatic studies have shown that substrate concentration, temperature, pH and the presence of enzyme cofactors are essential parameters for achieving a successful production yields. Results indicated that the temperature must be between 30 °C and 55 °C, pH between 5.0 and 6.5, and the presence of  $\text{Mn}^{2+}$  might be necessary, in some cases, for a

hydrolysis step when the reaction starts from sucrose [14]. The mechanism of action of levansucrase has been clarified by Chambert and Gonzy-Tréboul [15] suggesting a Ping-pong mechanism for explaining the hydrolysis and transferase activity. The presence of the first substrate (sucrose) induces a modification in the enzyme that allows the reaction of a second substrate (fructose), to be polymerized. Specifically, an intermediate is formed between enzyme and fructosyl residue,

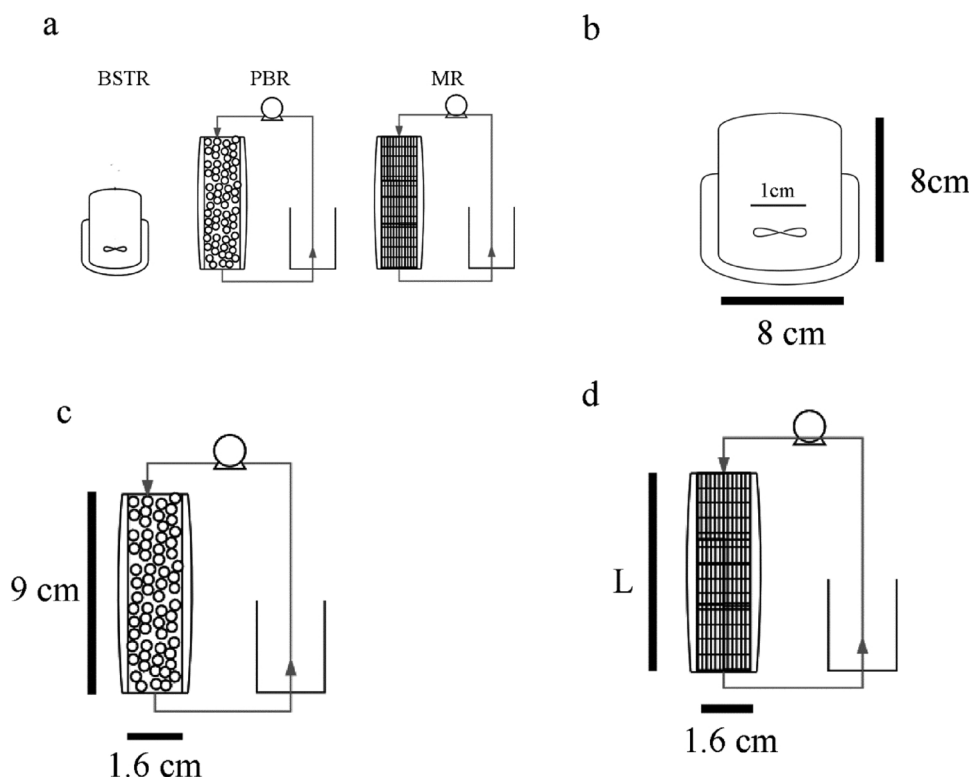


Fig. 1. A: Scheme of the reactors compared in this study. B: batch stirred tank reactor, C: packed bed reactor, D: monolithic reactor.

reducing the formation enthalpy for the incorporation of the next fructosyl residue. The enzyme follows a Michaelis-Menten kinetics [16].

These studies were carried out by using free levansucrase in the reaction systems, without considering a possible enzyme immobilization on a solid support. Enzyme immobilization offers a wide range of advantages, such as an increase in its useful life (crucial step due to the elevated cost of purified enzymes), an increment in stability at non-optimal conditions (variations in pH or temperature) and the possibility to recover the enzyme and reuse it [17] in further cycles. Therefore, an enzyme immobilization process will reduce significantly the polymer production costs.

A few papers have explored that possibility [17–20], obtaining successful results by performing the immobilization with a covalent union levansucrase-supports. However, stability, selectivity, or kinetics rates have been modified. As an example, Esawy et al. [18] performed the immobilization of levansucrase with calcium alginate beads, but its immobilization yield was less than 5% and that option was discarded. Chiang et al. [20] modified *Z. mobilis* by genetic engineering in order to create a domain for chitin-beds binding to obtain a proper immobilization yield. Nevertheless, enzymatic activity decreased to a value of around 35–60% of the free-enzyme. Finally, Hill et al. [17] were able to obtain an enzyme retention activity up to 67% by using glyoxyl agarose-IDA/Cu as an immobilization support.

There are not studies concerning levansucrase immobilization in supports for producing levan in an industrial way because most of the works did not consider the effect of experimental parameters for a scaling-up. These studies were not focused on the possibility of using the obtained levan as a carrier for drug delivery systems, and it is unknown if the enzyme immobilization process can produce an important effect on the levan nanoparticles (in terms of size and zeta-potential) that are obtained after levan self-assembly phenomenon in water. Moreover, the possibilities of these processes for industrial applications have not been studied in terms of economical estimations.

For that reason, the main objective of this work is the development and validation of two processes to obtain levan by immobilizing the enzyme levansucrase (specifically Fructosyltransferase 68A from *Bacillus subtilis*) in two different supports (alginate beads in a packed bed reactor and a porous monolith). Results in terms of levan production, economical costs and the obtained nanoparticles size of these two systems will be compared with the results in a batch system. Kinetic and mass transfer phenomena with a techno-economic evaluation will be also performed to assess scale-up possibilities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Process design and support preparation

Three different configurations (Batch Stirred Tank Reactor (BSTR) with free enzyme; a packed-bed reactor (PBR) with immobilized enzyme and a monolith reactor (MR) with immobilized enzyme) were designed.

A scheme of the used systems is showed in Fig. 1a. Reactors schemes with their dimensions are illustrated in Fig. 1b, c, and d respectively. In all of them, the used enzyme (Fructosyltransferase 68A from *Bacillus subtilis*) was purchased from Creative Enzymes (USA). Fructosyltransferase or Levansucrase (LS) was stored at -20 °C in a Na-HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) medium (pH 7.5) until its use. This buffer is widely used for maintaining enzyme structure because it keeps pH constant despite of changes in carbon dioxide concentration.

The methodology for the different used configurations is:

**Batch Stirred Tank Reactor:** 30 mL of a sucrose solution (at different concentrations depending on the experiments, from 100 to 500 mM) was loaded into the BSTR, and 20 µL of enzyme solution (1 mg mL<sup>-1</sup>) was added simultaneously. The vessel was continuously stirred at 300 rpm and thermostatically controlled with water at 37 °C

(optimal operational temperature for fructosyl-transferase enzyme, according to [21]).

**Packed Bed Reactor:** this reactor was packed with alginate-calcium capsules (diameter from 2 to 3 mm) that contain the enzyme. Alginate capsules were produced by a reticulation process with calcium chloride. Sodium alginate solution was prepared at 2% (w/w) and the enzyme was added into the alginate solution up to an enzyme concentration of 1 µg·mL<sup>-1</sup>. That solution was added dropwise to calcium chloride solution at 2% (w/w) with a needle (diameter of 0.50 mm). After that, capsules were washed three times with distilled water to reduce the amount of calcium free on solution. The encapsulation yield was obtained by determining the amount of enzyme in CaCl<sub>2</sub> solution (using *Biodrop*, absorbance at 280 nm, molar absorption coefficient: 64,750 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Spheres were loaded into the PBR (length 9 cm and width-diameter 1.6 cm) at different amounts in order to achieve different values of porosity. Once the PBR is loaded, the experiment starts by pumping, 20 mL of solution 90 g·L<sup>-1</sup> sucrose (Pumpdrive 5201; C8 Cassette, Heidolph, Germany) and the amount of polymer was measured by spectrophotometry (wavelength 400 nm) in the auxiliary vessel (Fig. 1c) at different times for kinetics calculation [22]. PBR characteristics are:

- Porosity: around 0.64
- Surface area: 821 cm<sup>2</sup>
- Average diameter beds: 0.21 cm
- Packed bed reactor length: 9 cm
- PBR column width (diameter): 1.6 cm

**Monolith Reactor:** a super-porous agarose-monolith was produced by an emulsification method, following the procedure described by Elviro et al. [23]. That synthesis is based on the generation of an emulsion by mixing a polysaccharide gel (Agarose D5, the continuous phase) and a porogen agent. This porogen agent is formed by an organic solvent and a detergent, and it generates the superporous structure when temperatures below gelation temperatures are reached. Later, the porogen agent is removed by washing. The detergent must behave as a surface-active agent to stabilize the oil-in-water emulsion. Monolith characteristics were determined by Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) after being cut in thin slices of 0.2–0.3 mm. The images were processed by using *ImageJ* software [23]. The structure has the following characteristics:

- Porosity: 0.34
- Surface area: 779.53 cm<sup>2</sup>
- Average pore diameter: 38.1 µm
- Average thickness between pores: 68.1 µm
- Monolith length: 2 cm
- Monolith width (diameter): 1.6 cm

Afterwards, monolith was introduced in a thermostatically controlled column and LS was immobilized due to the electrostatic interaction between copper and histidine at levansucrase surface [24]. For immobilization, enzyme solution in phosphate buffer pH 7.4 was pumped (Pumpdrive 5201; C8 Cassette, Heidolph, Germany) into the MR at 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. The adsorption efficiency was determined experimentally by spectrophotometry at 280 nm (Vega et al., 2017).

After that, for operating, 20 mL of sucrose solution (90 g·L<sup>-1</sup>) was pumped into the reactor (Pumpdrive 5201; C8 Cassette, Heidolph, Germany) and the amount of polymer was measured in the auxiliary vessel (Fig. 1d) at different times for kinetics calculation.

### 2.2. Polymer isolation

Levan must be isolated from the different reaction systems in order to perform its characterization, and also to study the nanoparticles that can the polymer form by self-assembly in water. Specifically, levan was



isolated from the solution after 24 h of reaction (fructosyl-transferring reaction is stopped), by following the methodology published by [41]. Basically, that methodology involves the addition of KOH (0.1 N),  $\text{CaCl}_2$  (1% w/w) and ethanol (96%). More information about that process can be found in Jathore et al., 2012. The same isolation process was carried out for the three reactors.

### 2.3. Pressure drop in column studies

Levan scaling-up process can be hindered by a pressure drop increase when column volume was expanded. For that reason, pressure drop was measured by using FPLC Akta Purifier 10 at different flow rates for the same design of columns (MR used was 2 cm length and PBR was 3 cm length with a porosity of 0.64).

### 2.4. Enzyme stability studies

In order to evaluate enzyme stability after being supported in PBR or in MR, the same experiment was repeated every 24 h (same support, initial sucrose concentration, porosity and length, flow rate, etc.), and kinetics velocities were compared in order to determine at what time the enzyme loses its activity.

Moreover, in monolith's case, it was also analysed the effect of enzyme elution on catalysis kinetics. That was evaluated by eluting the enzyme with EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 50 mM owing to EDTA removes  $\text{Cu}^{2+}$ -enzyme [25]. Afterwards, the eluted enzyme was added into a sucrose solution ( $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and the evolution of substrate was monitored with the aim of comparing that new kinetic with the batch with pure enzyme.

### 2.5. Nanoparticles characterization from polymer

Levan amphiphilic properties provides special characteristics concerning nanoparticles formation in water by a self-assembly phenomenon. However, the effect of the enzyme immobilization on the produced nanoparticles has not studied yet. In order to do that, nanoparticles of the obtained levans from the different processes were characterized in the following way. After polymer isolation, levan was dispersed in water (concentration of  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in order to form the nanoparticles by a self-assembly process. Due to its amphiphilic character, the polymer molecules are able to rearrange (in water) into nanoparticles with a hydrophobic environment inside them. Nanoparticles obtained from the three different reactors were characterized in terms of size and Zeta potential by Dynamic Light Scattering using a Malvern ZS Nano equipment.

Moreover, in PBR case, some polymer can be entrapped inside the

beads and must be recovered by a disintegration of the alginate beads when the reaction is finished. Alginate beads were disintegrated by dispersing the beads in citrate buffer (100 mM) for 3 days. After that, beads were sonicated for 10 min at  $30^\circ\text{C}$  (Ultrasound Starsonic 90, Liarre), followed by vortex agitation and a centrifugation process at 7000 rpm for 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804). The supernatant, containing the nanoparticles formed by the remaining polymer inside the beads, was measured by DLS.

### 2.6. Techno-economic study: viability

In order to scale-up both processes, the different processes flow-sheets were defined, and after that, mass and energy balances were performed by using experimental data. Then, based on the previous calculations, the required equipment was designed. In this case, the techno-economic study was done only for the processes in which the enzyme was immobilized due to the possibility of preserving enzyme activity.

Economic study was done by estimating the equipment prices and different percentages were applied to the total equipment cost with the aim of estimating the annual production cost and the fixed capital cost. Those percentages were taken from different references, providing a deviation of about 30%.

## 3. Mass transfer study

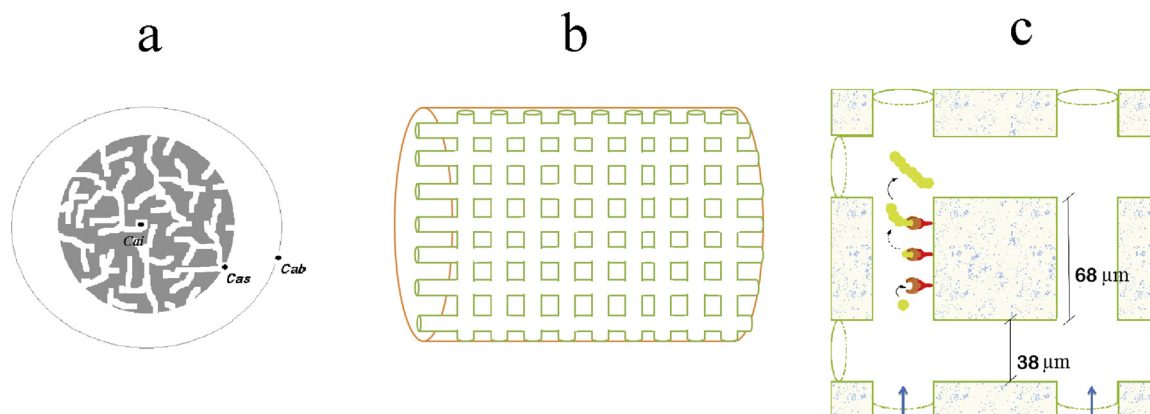
The study of mass transfer in immobilized reactors is a key step for their scaling-up. The probability of velocity fluctuations and concentration gradients at large scale requires a deep knowledge of the process in order to determine the size and dimensions of the required equipment. Moreover, the values of some dimensionless numbers can be used to compare systems and decides the best reactor for an industrial production with the enzyme immobilized. The following considerations were assumed to calculate the mass transfer parameters in the monolith reactor and in the packed bed reactor:

- Enzyme distribution sideways and lengthways of both reactors is considered uniform (constant):

$$\frac{\partial C_{enz}}{\partial z} = 0; \quad \frac{\partial C_{enz}}{\partial r} = 0$$

- Radial dispersion is considered negligible and sucrose concentration only varies in Z axis:

$$\frac{\partial C_s}{\partial z} \neq 0; \quad \frac{\partial C_s}{\partial r} = 0$$



**Fig. 2.** Scheme of the supports. A: alginate bead, B and C: superporous monolith simplification. In Fig. 2c, green spheres represent the fructose molecules, brown symbol represents the enzyme, red symbol represents the spacer arm (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).



- Levansucrase follows Michaelis-Menten kinetics (Eq. (1)),

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot C_s}{K_M + C_s} \quad (1)$$

- Sucrose concentration in bulk is considered constant along the column, for intern mass transfer calculation. Therefore, sucrose concentration in bulk can be considered as a medium value between input and output concentration (Eq. (2)). These values assure that the system is working at Vmax.

$$C_{Sb} = \frac{C_s^{input} + C_s^{output}}{2} \quad (2)$$

- Monolith Reactor is simplified to a network of channels with constant diameter. These channels are laid out in parallel and perpendicularly between them. Channel is considered as a cylinder with a defined length (see Fig. 2).

### 3.1. Mass transfer for packed bed reactor

Mass transfer process in PBR usually is characterized with Frössling equation, which is specifically proposed to describe the flux around particles or spheres (Eq. (3)).

$$Sh = 2 + 0.6 \sqrt{Re_p} \sqrt[3]{Sc} \quad (3)$$

The dimensionless numbers are defined as follows (Eqs. (4),(5) and (6)):

$$Sh = \frac{K_f D_p}{D'_s} \quad (4)$$

$$Re_p = \frac{d_p \cdot \rho \cdot v}{\mu} = \frac{d_p \cdot \rho \cdot Q}{\mu \cdot A} \quad (5)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D'_s} \quad (6)$$

$D'_s$  is sucrose diffusivity coefficient corrected with tortuosity value. The stochastic distribution of spheres cause pores that can affect diffusion phenomenon. Tortuosity can be estimated from porosity in PBR with spheres, following the correlation of Neale and Nader (1973). Coefficient correction, Neale and Nader correlation and the equation for porosity calculation can be read below (Eqs. (7),(8) and (9) respectively)

$$D'_s = \frac{D_s}{\tau^2} \quad (7)$$

$$\tau^2 = \frac{3 - \varepsilon}{2} \quad (8)$$

$$\varepsilon = \frac{\text{Volume of voids}}{\text{Total volume}} \quad (9)$$

From Sh number, it is calculated the value of liquid-solid mass transfer coefficient, that allows to estimate the Damköhler number (Da). Da for Michaelis-Menten kinetics is defined in Eq. (10):

$$Da = \frac{V_{max}}{K_f \cdot a \cdot K_M} \quad (10)$$

On the other hand, it is necessary to calculate the Thiele modulus ( $\Phi$ ) to determine the effectiveness factor of intern mass transport. Thiele modulus for Michaelis-Menten kinetics in a PBR is defined as follows [26] (Eq. (11))

$$\phi = \frac{1}{a} \sqrt{\frac{V_{max}}{K_M \cdot D_{S,eff}}} \quad (11)$$

According to Chai et al., [27]; for this type of alginate beds,  $D_{S,eff}$  is dependent on the alginate concentration. Those authors obtained a

value of  $6.2 \cdot 10^{-10}$  ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ) for 2% w/w alginate (concentration used in the paper). Therefore, intern-effectiveness factor is calculated by following the correlation for spherical geometry [28], that is described in Eq. (12).

$$\eta_i = \frac{3}{\phi} \left[ \frac{1}{\tanh(\phi)} - \frac{1}{\phi} \right] \quad (12)$$

Once that both parameters have been determined, the concentration of sucrose in sphere surface ( $C_{Ss}$ ) can be calculated by using the following dimensionless parameters:

$$C_S^* = \frac{C_{Ss}}{C_{Sb}}; \beta = \frac{K_M}{C_{Ss}}; \alpha = \eta_i \cdot Da + \beta - 1$$

These parameters are related by the Eq. (13):

$$C_S^* = \frac{-\alpha \pm \sqrt{\alpha^2 + 4\beta}}{2} \quad (13)$$

Finally, extern-effectiveness factor is computed as the division between the rate in heterogeneous reactor and the rate in homogenous reactor (Eq. (14)).

$$\eta_e = \frac{r_{A(het)}}{r_{A(hom)}} = \frac{\frac{V_{max} \cdot C_{Ss}}{K_M + C_{Ss}}}{\frac{V_{max} \cdot C_{Sb}}{K_M + C_{Sb}}} = \frac{C_{Ss}(K_M + C_{Sb})}{C_{Sb}(K_M + C_{Ss})} \quad (14)$$

In this system, catalysis occurs because sucrose can diffuse through the tight porous of alginate capsules. For that reason, mass transport balance into bed pores is described in Eq. (15), which allows calculating the concentration for each distance (r) to the center of the particle (R):

$$\frac{C_{Si}}{C_{Ss}} = \frac{1}{r^*} \left[ \frac{\sinh(\phi r^*)}{\sinh(\phi)} \right]; r^* = \frac{r}{R} \quad (15)$$

A simplified scheme is presented in Fig. 2a.

### 3.2. Mass transfer for monolith reactor

In order to evaluate mass transfer effects on the monolith, a simplification on its structure is considered. Channels are supposed to be laid out in parallel between them in two space directions. Fig. 2b shows the model used for mass transfer calculation in MR.

For external mass transfer evaluation, Tronconi and Forzatti [29] proposed an equation for determining the Sherwood number (Eq. (16)). And then, external mass transfer coefficient ( $K_f$ ) is calculated from Sh number.

$$Sh = 3.657 + 8.827 \cdot \left( \frac{1000}{Gz} \right)^{-0.545} \cdot \exp \left( \frac{-48.2}{Gz} \right) \quad (16)$$

The dimensionless numbers are defined as follows (Eqs. (17),(18), (19) and (20))

$$Sh = \frac{K_f \cdot L_{ch}}{D_F} \quad (17)$$

$$Re_{(ch)} = \frac{d_{ch} \cdot \rho \cdot v}{\mu} = \frac{d_{ch} \cdot \rho \cdot Q}{\mu \cdot A} \quad (18)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D_S} \quad (19)$$

$$Gz = \frac{Re_{ch} \cdot Sc \cdot d_{ch}}{L_{ch}} \quad (20)$$

Channel length ( $L_{ch}$ ) is 68.1  $\mu m$  (thickness is also 68.1  $\mu m$ , as can be observed in Fig. 2c). That figure also illustrates how transfructosylation takes place inside the pores. In Fig. 2c it is represent the spacer arm (red symbol) which is linked with the enzyme (brown symbol), that is catalysing the polymerization of the fructose units (green spheres) obtained by the hydrolysis from sucrose.

In order to evaluate internal mass transfer, Thiele modulus was determined by using a modification of the equation proposed by Kalluri et al. [30]. That equation considers the thickness between channels and a first order kinetic (Eq. (21)).

$$\phi = b_{ch} \sqrt{\frac{Kr}{D_s}} \quad (21)$$

Nevertheless, enzymes usually follow a Michaelis-Menten kinetic which does not fit with a first order kinetics. Operational conditions set sucrose concentration at 2 times the value of  $K_M$  for the enzyme, and therefore, the kinetic equation can be simplified (Eq. (22)).

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot C_s}{K_M + C_s} = \frac{V_{max} \cdot C_s}{3 \cdot K_M} \text{ (if } C_s \approx 2 \cdot K_M) \rightarrow Kr \approx \frac{V_{max}}{3 \cdot K_M} \quad (22)$$

By substituting the new  $Kr$  expression on Eq. (21), it is possible to calculate the Thiele modulus for MR.

Afterward, intern-effectiveness factor for a planar surface is estimated with Eq. (23).

$$\eta_i = \frac{\tanh(\phi)}{\phi} \quad (23)$$

After that, the concentration on monolith surface ( $C_{ss}$ ) and the external effectiveness factor can be estimated by using the dimensionless numbers described in Section 3.1 (Damköhler,  $C_s^*$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ ).

Values obtained from mass transfer calculations for both reactors will be given in the results section. Moreover, contour plots were built by MATLAB software (by implementing the equations), in order to show the evolution of the sucrose concentration with the reactor spatial distribution.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Immobilization yield

In order to quantify this parameter, enzyme was measured after its immobilization for both systems. Immobilization percentage (amount of held enzyme divided by total amount) in alginate-beds for PBR ranged from 72% to 84%. These results are significant higher than the results (less than 5%) published by Esawy et al. [18]. This difference is explained by the differences in  $CaCl_2$  concentration used for beds preparation because an increase in  $Ca^{2+}$  concentrations allows a quick cross-linking and avoids enzyme diffusion.

MR is able to immobilize high amounts of enzyme up to 5–6 mg·cm<sup>-3</sup> support. However, the required amount to be immobilized in the MR is 2 mg·cm<sup>-3</sup> support, and therefore, all the initial amount enzyme is immobilized in the MR.

### 4.2. Kinetics parameters determination. Batch experiments

Kinetics parameters of the enzyme were determined by performing some experiments in BSTR (Fig. 1a) with different initial amounts of substrate. The polymerization was followed by analysing the amount of polymer produced.

Results are given in Table 1, and as can be observed, enzymatic kinetics follows Michaelis-Menten (MM) behaviour. MM model is given in Eq. (24).

$$\frac{dC_s}{dt} = v_0 = -\frac{V_{max} \cdot C_s}{K_M + C_s} = -\frac{K_{cat} \cdot [E] \cdot C_s}{K_M + C_s} \quad (24)$$

Therefore, velocity rate was calculated with different initial amounts of sucrose by using Lineweaver-Burk equation. Enzyme concentration in batch experiments was kept constant. Results obtained are:  $K_M = 229$  mM and  $K_{cat} = 2.08 \cdot 10^4$  (U·mg<sup>-1</sup>). Since the amount of enzyme is known; it is possible to calculate the maximal velocity of reaction ( $V_{max}$ ), that was: 13.7 mM·min<sup>-1</sup>. The quotient of the constants ( $K_{cat}/K_M$ ) was compared with other values reported in the

literature for the total activity of levansucrase with high-purity. This quotient has a value of 0.091 (L·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) for the levansucrase purified from *Bacillus amyloliquefaciens* [31] and 0.119 (L·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>) for the levansucrase studied in this work. Therefore, the value is in the same order of magnitude, indicating that kinetic approach has been performed correctly.

### 4.3. Pressure drop studies

Pressure drop was studied by following the procedure described in Section 2.3. Results for PBR and MR are shown in Fig. 3 (pressure drop is relativized by the length of the column: MPa/m). In both cases, at low flow rates (< 10 mL·min<sup>-1</sup>), there is not a significant increase in pressure drop for both columns. As flow rates increases, pressure drop becomes significant, and in general, it is higher in PBR than in MR. The pressure drop increases because of the friction with the elements inside the column. The value is higher for PBRs because the random distribution of spheres provokes more difficulties for fluid transport than the channel distribution in the MR (see Reynolds number differences in Table 2). If pressure drop values are compared with other supports at similar velocities, MR offers less pressure drop than other supports such as PorosHS20 or CIM S03-1 monolith [32].

### 4.4. Enzyme stability studies

As was described in Section 2.4, the same experiment was repeated every 24 h in order to determine the time that the enzyme can be used without a significant decrease in its activity. For MR, results have shown that activity remains constant until day 15th and for PBR until day 8th. Therefore, a useful life for MR could be estimated in two weeks, and one week for PBR. Those results enhance the further application of these supports for an industrial production of levan due to the high yield achieved with a very low amount of enzyme used.

Moreover, the activity of the enzyme eluted from MR was also evaluated. The enzyme was put in a solution of sucrose (90 g L<sup>-1</sup>) and the rate of sucrose disappearance was evaluated by DNS method. This result can be compared with the rate obtained from the native enzyme, directly used after purchased. The results are shown in Fig. 4.

Fig. 4 shows a decrease in the initial velocity in the case of the enzyme eluted, compared to native enzyme. That phenomenon can be explained by taking into account the process involved in that elution. Reagents and immobilization-elution process cause effects on enzyme stability and selectivity. Therefore, maximal velocity decreases from 14 mM·min<sup>-1</sup> to 3.6 mM·min<sup>-1</sup>. In spite of that fact, after 90–100 minutes it is achieved the same conversion yield with the enzyme eluted. That phenomenon suggests that it is possible to reuse the enzyme after its retention in MR but with a reduction in catalysis yield.

### 4.5. Nanoparticles characterization

The nanoparticles, formed by self-assembly in water, from the three reactors were characterized following the methods described in Section 2.5. Fig. 5 illustrates the particle size distribution of the obtained nanoparticles from each type of reactor (BSTR, PBR and MR).

Results indicated that particle size distribution is similar in batch

**Table 1**  
Kinetics results in BSTR.

Sucrose (mM)	Initial velocity ( $V_0$ ) (mM/min)
100	0
139	1.17 ± 0.11
222	4.55 ± 0.19
333	13.8 ± 0.31
416	13.7 ± 0.28
500	13.9 ± 0.23

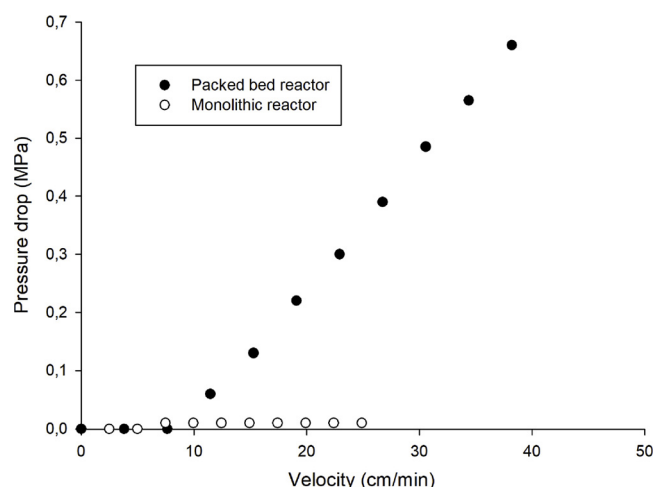


Fig. 3. Pressure drop in both reactors (PBR and MR).

Table 2

Mass transfer parameters for PBR and MR.

	PBR	MR
Tortuosity ( $\tau$ )	1.084	1.15
$D'_F$ ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )	$5.617 \cdot 10^{-10}$	$4.66 \cdot 10^{-10}$
Reynolds number	2.682	$9.33 \cdot 10^{-3}$
Schmidt number	$1.780 \cdot 10^4$	$2.17 \cdot 10^3$
Sherwood number	27.57	3.657
Graetz number	–	10.54
Kfa ( $\text{s}^{-1}$ )	0.301	0.031
Damköhler number	$3.75 \cdot 10^{-3}$	$2.53 \cdot 10^{-2}$
Thiele modulus ( $\Phi$ )	4.95	0.055
Bulk $C_{Sb}$ (mM)	442.7	489.75
Surface $C_{Ss}$ (mM)	442.0	481.40
Intern $C_{Si}$ (mM)	32.27	–
Extern-Eff. ( $\eta_e$ )	0.999	0.995
Intern-Eff. ( $\eta_i$ )	0.483	0.999

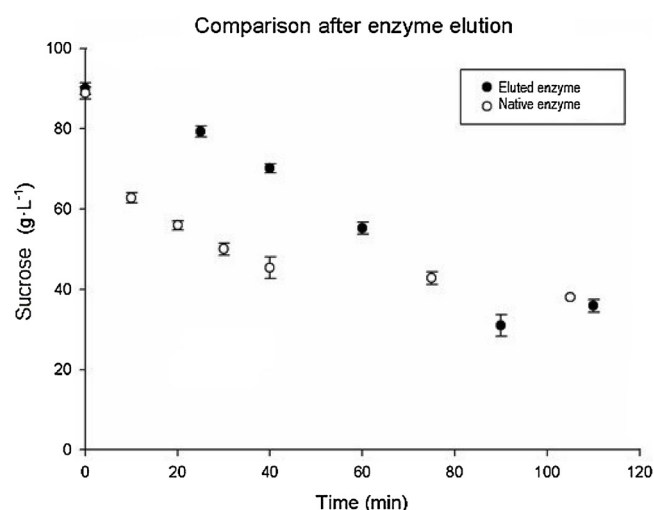


Fig. 4. Enzymatic activity after protein elution in MR, after 15 cycles (15 days).

reactor and monolithic reactor (average 130 nm), whereas a significant increase in size is observed for the NPs obtained by PBR (average 250 nm). It is possible to take advantage of this phenomenon because the desired particle size depends on the application. Tailoring particle size can be used for designing nanoparticles “*a la carte*”.

Particle size distribution of 230 nm was obtained from the polymer in the auxiliary vessel in the PBR. As was said before, some polymer remains inside the alginate beads due to diffusional limitations.

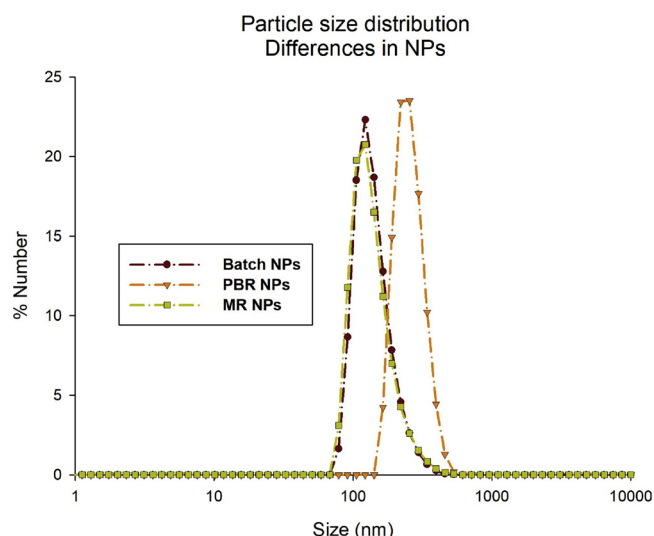


Fig. 5. Particle size distribution of NPs from different reactors. Red dots: polymer from batch, orange triangles: packed bed reactor, green squares: monolithic reactor (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

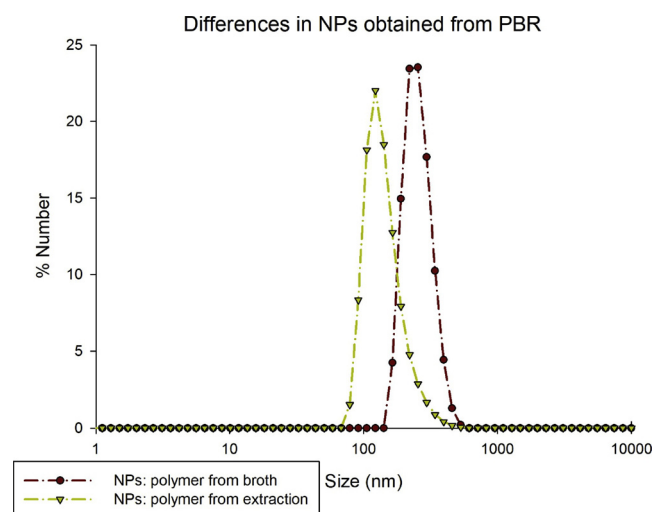


Fig. 6. Particle size distribution of NPs from PBR. Red dots: polymer from broth, green triangles: polymer from beads after extraction (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Polymer was extracted from alginate beads following the protocol described in Section 2.5, and the particle size distribution obtained is represented in Fig. 6.

Results indicated that polymer entrapped in alginate beads forms smaller nanoparticles (average 90 nm) than the ones obtained from the broth. These differences can be explained because the microenvironment in which polymerization occurs can modify molecular weight or branching of the polymer, producing modifications on particle size [33]. In all cases presented above, the polydispersity index (PDI) has a value less than 0.1, which indicates an appropriate monodispersity.

Concerning the surface charge of the particles, zeta potential measurements were carried out by DLS. The zeta potential values of NPs from each type of reactor are the followings: -2.40 mV for BSTR, -1.90 mV for MR and -1.26 mV for PBR. Therefore, no significant differences are observed among the systems. Results are in accordance with others presented previously in literature [34], in which, levan nanoparticles have a low surface charge, but they remain stable in solution due to different repulsive forces.

According to Hoshyar et al. [35], the ideal size of nanoparticles is among 10 nm and 200 nm. Nanoparticles should be larger than 10 nm to avoid kidney filtration or blood brain barrier transfer, and smaller than 200 nm in order not to activate the complement system and therefore, be removed from the blood stream. The nanoparticles obtained by using these reactors, satisfy these conditions and can be used as promising carriers for drug delivery systems [8].

#### 4.6. Mass transfer model – parameters determination

Mass transfer parameters were calculated for PBR and MR. In both cases, the flow rate used was  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Table 2 represents the values for both types of reactors.

The process for parameter determination was executed as follows:

In **PBR**, firstly, in order to compute the diffusivity value, it is necessary to calculate the tortuosity by using the porosity. Once those values were obtained, Re number, Sh number, Kfa, Da number and Thiele modulus ( $\Phi$ ) were calculated (results are shown in Table 2). From those values, sucrose concentrations were calculated ( $C_{Fs}$ ,  $C_{Fb}$ , and  $C_{Fi}$ ) and effectiveness factors were also determined by following the equations given in Section 3.

For those calculations, sucrose diffusion coefficient was obtained from literature [27] with a value of  $6.2 \cdot 10^{-10} \text{ (m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ . The concentration of enzyme was estimated by using the encapsulation yield (approximately 75% for a concentration of  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). The sucrose concentration inside the particle was calculated in a point very near to the centre of the particle ( $r^* = 0.1$ ).

As can be seen in Table 2, the main barrier for an effective operation is internal resistance due to problems for diffusion in alginate capsules.

In **MR**, the calculus process follows the model set in previous section. As can be seen in Table 2, it is possible to conclude that monolith reactor avoids mass transfer limitation because its global effectiveness-parameter was 0.99 for the condition investigated. Besides, there are no significant differences between concentration in bulk and in monolith wall-surface; and reaction is only controlled by enzymatic kinetic (that fact is verified due to the low value of the Damköhler number).

For both reactors, mathematical equations were implemented in MATLAB software in order to build contour plots to get a better understanding of the mass transfer phenomena for both systems. Fig. 7 shows the results: Fig. 7a is a model of PBR, Fig. 7b shows an enlarged image of one region in PBR (only one sphere) and Fig. 7c represents the concentration gradient in a channel in MR (from bulk to agarose wall).

#### 4.7. Techno-economical results

##### 4.7.1. Processes description

Scaling-up calculations for both processes were done with the aim of performing a techno-economical evaluation. In this context, the above

mentioned processes were designed to produce 500 kg of levan per year with a purity of 80%. The purity of levan is calculated as the mass of levan over the total mass of solids (levan and other mono or oligo-saccharides). Figs. 8 and 9 show both processes and information concerning process conditions. Mass balances results have been included in the supplementary material (Table S1 for the PBR process whereas Table S2 for the MR process). The differences between both processes are explained below.

The process with the enzyme in alginate beads is composed by different stages (Fig. 8), such as alginate beads preparation, sterilization, reaction and purification.

Firstly, alginate capsules are produced in a discontinuous way by mixing in a stirred tank (MT-01) sodium alginate with water with a concentration of about 2% w/v during two hours. After that, the enzyme is solubilized in the alginate solution (concentration:  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) in a different tank (MT-02) for 30 min with stirring (300 rpm). Then, 3.53 litres of calcium chloride (concentration of 0.1 M) is added dropwisely to encapsulate the enzyme. This step finishes with the obtention of the capsules by sedimentation followed by a subsequent washing process in a conveyor belt. Those capsules are then introduced in the reactor.

At the same time, sucrose is mixed with water in MT-03 and the mixture is sterilized with three heat exchangers previous a mixing (MT-04) with the sucrose and water that is recirculated from the reactor R-01 (minimum time for sterilization: 20 min, minimum temperature:  $121^\circ \text{C}$ ). Subsequently, the solution is introduced in a tank with a sucrose concentration of about  $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (MT-05). Since the reactor is filled with water at the beginning, the concentration of the fluid must be higher, to obtain a final concentration of  $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , that is the optimum value according to the experiments (working at  $V_{\text{max}}$ ). This solution is fed to the reactor, and recirculated to the mixing tank during the reaction time. When the reaction is finished (around 20 min), MT-05 is emptied, directing the mixture (with  $62.4 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$  of levan) to the purification step. In this case, compositions of streams 21 and 22 are not included in the figure because that composition changes with time. The reactor is then cleaned with water, and it is replaced by another reactor to restart the process.

Five reactors are needed to operate in a continuous way. While one is producing levan, the substrate is being introduced in another one with the alginate capsules and the third one is cleaned. The fourth one has to be filled with alginate capsules and the last one is for emergencies. Finally, levan is subsequently recovered by ultrafiltration (1 kDa cutoff) and the sucrose is recirculated to the MT-04. Finally, a tray drier is used to remove the water in the polymer.

The process with the monolithic reactor (Fig. 9) has a previous stage in which the monoliths supports are prepared, activated and loaded with copper. Beds are subsequently stored at  $-18^\circ \text{C}$  to be used when needed. In this context, monolith bed porosity is about 0.34.

This levan production process is basically composed by sterilization,

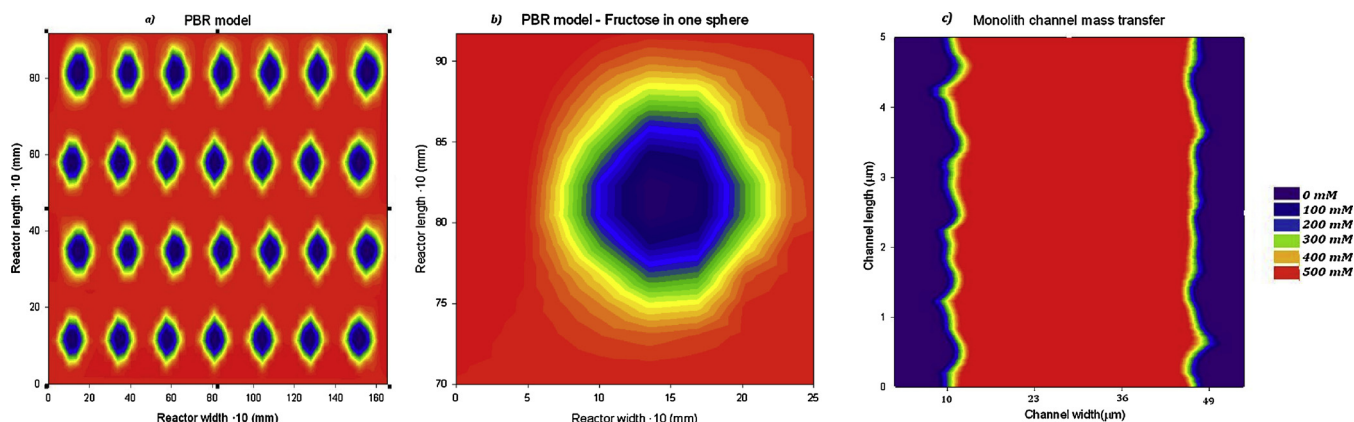


Fig. 7. Results of simulation of mass transfer phenomena in PBR (a and b) and MR (c).

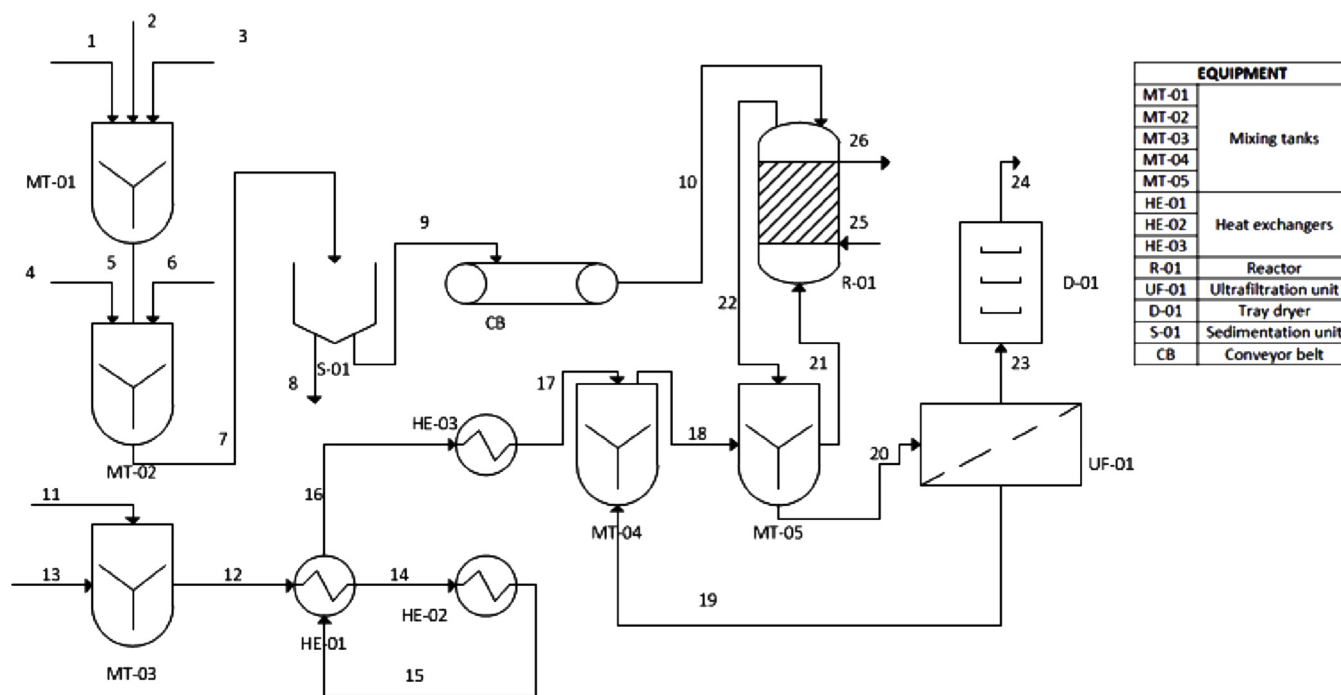


Fig. 8. Plant process design for PBR.

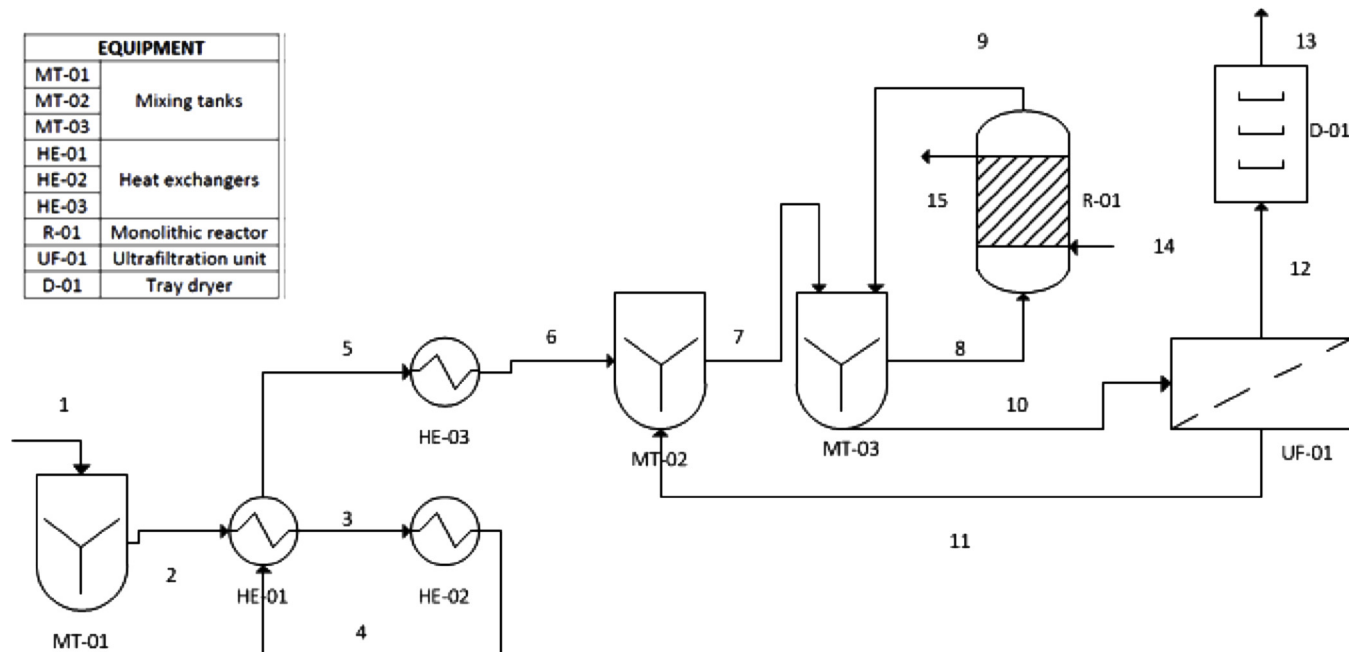


Fig. 9. Plant process design for MR.

reaction and purification stages. Sterilization and purification operate in a continuous way, whereas reaction operates in batch regime.

The process starts with a stirred tank to mix sucrose with water at 20 °C (MT-01). This mixture is sterilized with two heat exchangers, and after that is cooled to 36 °C, that is the reaction temperature. The water-sucrose mixture is then introduced in another mixture tank (MT-02) where the recycled sucrose is added. Then, once MT-03 is filled (in one hour), the mixture is discharged to the reactor, where the sucrose is enzymatically transformed to levan. According to the experimental conditions, the optimal concentration (working at  $V_{max}$ ) is 90 g·L<sup>-1</sup> to consume almost 50% of the sucrose, although with only a 5.56% conversion to levan because some fructooligosaccharides are produced.

That value was selected as the best in the balance substrate used – conversion reached. While one reactor is working, another reactor is cleaned. Besides, two more reactors are needed because enzyme immobilization begins before the enzyme deactivation of the two reactors in the main line (14 days) and one reactor is needed for emergencies. Since reaction time is 1 h, 24 cycles/day can be carried out and 0.063 kg of levan are produced by cycle. After that, the polymer is recovered by using an ultrafiltration (cutoff 1 kDa) system that provides a tool to recycle the substrate to the MT-02. Finally, the levan is dried by using a tray dryer.



**Table 3**  
Summary of fixed capital costs.

Item	Alginate-enzyme plant (€2019)	Monolith plant (€2019)
Major equipment (f1)	14000	125000
Equipment erection (f2) = 0.40*f1	55000	50000
Piping (f3) = 0.70*f1	95000	85000
Instrumentation (f4) = 0.20*f1	27000	25000
Electrical (f5) = 0.10*f1	14000	10000
Building, process (f6) = 0.15*f1	21000	20000
Physical plant cost (1-6) = f7	350000	315000
Design and engineering (f8) = 0.30*f7	105000	95000
Contractor's fee (f9) = 0.05*f7	17000	15000
Contingency (f10) = 0.10*f7	35000	30,000
FIXED CAPITAL (FC)	500,000	460000

**Table 4**  
Summary of production costs.

Item	Alginate-enzyme plant (€2019/year)	Monolith plant (€2019/year)
Raw materials (1)	300000	400000
Miscellaneous materials (2) = 0.10*(4)	5100	4600
Utilities (3) = 0.10*(1)	30000	40000
Variable costs (A) = (1 + 2 + 3)	335000	446000
Maintenance (4) = 0.10*FC	50000	46000
Operating labour (5)	1000000	1000000
Laboratory costs (6) = 0.20*6	200000	200000
Supervision (7) = 0.20*6	200000	200000
Plant overheads (8) = 0.10*FC	50000	50000
Capital charges (9) = 0.10*FC	50000	46000
Insurance (10) = 0.01*FC	5000	4600
Local taxes (11) = 0.02*FC	10000	9000
Royalties (12) = 0.01*FC	5000	4600
Fixed costs (B) = 4 + 5 + 6 + 7 + 8 + 9 + 10 + 11 + 12	2000000	2000000
Direct production costs (C) = A + B	2335000	2445000
Sales expense	470000	490000
General overheads (0.20*C)		
Research and development		
Annual production costs = C + (13)	2800000	2900000

#### 4.7.2. Equipment design and economic evaluation

In order to perform a comparison between both processes in terms of profitability, it is required to design the different equipment (based on the mass and energy balances) to evaluate the equipment cost. [Matche.com](#) [36], a web page that can be used for obtaining equipment cost estimations depending on the equipment measures was used for this purpose. After performing some calculations, several conclusions were obtained:

Due to the small plant capacity (only 500 kg per year), every heat exchanger were designed as double-pipe exchanger due to the small heat transfer area requirement. The highest calculated area (0.5 m<sup>2</sup>) was selected to estimate the price for every exchanger.

The mixing tanks were designed by using the experimental residence and the flow rate, obtaining as a result the vessel volume. Then, the height was considered two times the diameter and the ellipsoidal bottom was considered the fourth part of the diameter [37]. On the other hand, storage tanks were designed according to API-ASME rules. The volume of each tank was 250 liters because is the minimum volume that can be chosen. Finally, the ultrafiltration systems and the tray driers were chosen according to the flow rates that have to be treated. In this case, the ultrafiltration system price was estimated from [38].

Once the equipment price is estimated, the fixed capital cost and production cost were estimated by using the methodology proposed in Coulson and Richardson [37], that can provide deviations of about

30%. Results can be observed in [Tables 3 and 4](#). Items concerning utilities, storages, site development and ancillary building can be omitted for minor extensions.

As can be seen in [Table 3](#) the fixed capital is a bit higher for the plant with alginate. That is because the major equipment cost is higher for that plant. In this context, although the reactor cost is higher for the monolith plant (75,000 € against 30,000 €), it is important to highlight that the process with alginate needs more equipment. In any case, due to those facts, the difference is not really significative in terms of fixed capital cost between both plants.

After estimating the fixed capital, the production costs must be determined. We used again a method based on different percentages [37]. Raw materials costs were determined from flow-sheet, whereas operating labour was calculated by estimating the number of shift and day personal needed [39]. Finally, utilities costs were taken as the 10% of the raw materials [40]. That percentage is higher (a conservative approach) than the value of about 5% that was taken from a biotechnological process in which expensive bioreactors with a medium culture was used. Results are given in [Table 4](#), obtaining an annual costs of about 2,800,000 €/year for the plant with alginate capsules and 2,900,000 €/year for the plant with monolithic reactors. Annual costs are similar for both plants because although raw material cost is higher for the monolithic plant (more reactive are needed), the fixed capital is higher for the alginate, and as a consequence several items costs are increased.

Finally, since 500 kg/year have to be produced, the production cost (annual production costs/production rate) is around 5600 €/kg for the alginate with an enzyme plant whereas the production cost for the monolithic plant is about 5800 €/kg. These results highlights that production costs are similar for both plants, in spite of the differences between the processes.

## 5. Conclusions

Two new enzymatic processes for producing levan have been developed by immobilizing LS in a PBR and in a MR. Both systems have high rates of immobilization ( $\approx 80\%$  in PBR and  $\approx 100\%$  in MR), without producing a considerable reduction in enzyme activity. Furthermore, the stability of the enzyme was also studied and the results showed constant kinetics until day 14th in MR and day 8th in PBR. Moreover, it is possible to recover the enzyme with activity from MR after an elution process. Besides, techno-economic viability was analysed to indicate the main bottle-necks that can be found when scaling-up the previous processes at industrial scale. Those results showed that both processes are very similar in terms of production costs (6000 €/kg) and fixed capital costs (500,000 €). Additionally, mass transfer parameters were studied for both cases obtaining as a result low mass transfer limitation for both systems (mass transfer coefficient  $0.031 \text{ s}^{-1}$  for MR and  $0.301 \text{ s}^{-1}$  for PBR); hence a scaling-up process may be performed for both processes. Finally, it was showed that the obtained levan from MR and from the batch reactor can reorganize in nanoparticles (around 130 nm) due to the well-known self-assembly phenomenon. However, nanoparticles of about 250 nm were obtained for the levan that was obtained from the PBR.

## Acknowledgments

Authors want to acknowledge Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding support (Project Code: CTQ2016-78988-R). Álvaro González-Garcinuño also acknowledges his PhD grant (F.P.U.) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (Ref. FPU14/04914). Authors also acknowledge M. Elviro for her collaboration and help in monolith synthesis and enzyme immobilization.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107529>.

## References

- [1] A. González-Garcinuño, A. Tabernero, A. Domínguez, M.A. Galán, E. Martín del Valle, Levan and levansucrases: polymer, enzyme, microorganisms and biomedical applications, *Biocatal. Biotransform.* 36 (2018) 233–244.
- [2] J. Combie, Properties of levan and potential medical uses, Chapter 13 in book: *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications*, (2006), pp. 263–269. ACS Symposium Series.
- [3] K.K. Kim, C.B. Chung, Y.H. Kim, K.S. Kim, C.S. Hun, C.H. Kim, Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *J. Cosmet. Sci.* 56 (2005) 395–406.
- [4] C. Sturzoiu, M. Petrescu, B. Galateanu, M. Anton, C. Nica, G. Simionca, A. Dinischiotu, G. Stoian, *Zymomonas mobilis* levan is involved in metalloproteinases activation in healing of wounded and burned tissues, *Anim. Sci. Biotechnol.* 44 (2011) 453–458.
- [5] R.R. Costa, A.I. Neto, I. Calgaris, C.R. Correia, A.C.M. Pinho, J. Fonseca, E.T. Oner, J.F. Mano, Adhesive nanostructured multilayer films using a bacterial exopolysaccharide for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 2367–2374.
- [6] A. Osman, E.T. Oner, M.S. Eroglu, Novel levan and pNIPAA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release, *Carbohydr. Polym.* 165 (2017) 61–70.
- [7] A. Demir Sezer, H. Kazak, E.T. Oner, J. Akbuga, Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristic, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 358–363.
- [8] A. Tabernero, A. González-Garcinuño, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E.M. Martín del Valle, Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: stability and drug release studies, *Carbohydr. Polym.* 160 (2017) 26–33.
- [9] T. Zhang, R. Li, H. Qian, W. Mu, M. Miao, B. Jiang, Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 975–981.
- [10] R. Srikanth, C.H.S.S. Sundhar-Reddy, G. Siddhartha, M.J. Ramaiah, K. Babu-Uppuluri, Review on production, characterization and applications of microbial levan, *Carbohydr. Polym.* 120 (2015) 102–114.
- [11] E.T. Öner, L. Hernández, J. Combie, Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects, *Biotech. Adv.* 34 (2016) 824–844.
- [12] A. González-Garcinuño, A. Tabernero, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E. Martín del Valle, Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight, *Microb. Cell Fact.* 16 (2017) 91.
- [13] P. Santos-Moriano, L. Fernandez-Arrojo, A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A.O. Ballesteros, F.J. Plou, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 119 (2015) 18–25.
- [14] A. Szwengiel, K. Goderska, M. Gumienna, Synthesis of  $\beta$ -(2-6)-linked fructan with a partially purified levansucrase from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 131 (2016) 1–9.
- [15] R. Chambert, G. Gonzy-Tréboul, Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes, *Eur. J. Biochem.* 62 (1976) 55–64.
- [16] C.P. Strube, A. Homann, M. Gamer, D. Jahn, J. Seibel, D.W. Heinz, Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17593–17600.
- [17] A. Hill, S. Karboune, C. Mateo, Immobilization and stabilization of levansucrase biocatalyst of high interest for the production of fructooligosaccharides and levan, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 2440–2448.
- [18] M.A. Esawy, D.A.R. Mahmoud, A.F.A. Fattah, Immobilization of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties, *Braz. J. Chem. Eng.* 25 (2008) 237–246.
- [19] K.H. Jang, K.B. Song, J.S. Kim, C.H. Kim, B.H. Chung, S.K. Rhee, Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 23 (2000) 89–93.
- [20] C.J. Chiang, J.Y. Wang, P.T. Chen, Y.P. Chao, Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 445–451.
- [21] R. Dedonder, Levansucrase from *Bacillus subtilis*, *Meth. Enzymol.* 8 (1966) 500–505.
- [22] A. Vigants, S.P. Marx, R. Linde, S. Ore, M. Bekers, I. Vina, H.G. Hicke, A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase, *Curr. Microbiol.* 47 (2003) 198–202.
- [23] M. Elviro, M. Vega, E. Martín del Valle, M.A. Galán, Preparation and characterization of a macroporous agarose monolith as a stationary phase in IMAC chromatography, *Chem. Eng. Commun.* (2018) in press.
- [24] J. Porath, Immobilized metal ion affinity chromatography, *Protein Expr. Purif.* 3 (1992) 263–281.
- [25] J.W. Wong, R.L. Albright, N.-H.L. Wang, Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications, *Sep. Purif. Methods* 20 (1991) 49–106.
- [26] K. Schügerl, K.M. Bellgardt, *Bioreaction Engineering Modelling and Control*, Springer, Berlin, 2000.
- [27] Y. Chai, L.H. Mei, G.L. Wu, D.Q. Lin, S.J. Yao, Gelation conditions and transport properties of Hollow Calcium alginate capsules, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 228–233.
- [28] M.E. Davis, R.J. Davis, *Book: Fundamentals of Chemical Reaction Engineering*, McGrawHill, USA, 2012.
- [29] E. Tronconi, P. Forzatti, Adequacy of lumped parameter models for SCR reactors with monolith structure, *Aiche J.* 38 (1992) 201–210.
- [30] R.R. Kalluri, D.R. Cahela, B.J. Tatarchuk, Comparative heterogeneous contacting efficiency in fixed bed reactors: opportunities for new microstructured systems, *Appl. Catal. B* 90 (2009) 507–515.
- [31] F. Tian, S. Karboune, Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization, *J. Mol. Catal. B: Enz.* 82 (2012) 71–79.
- [32] Y. Wu, D. Abraham, G. Carta, Comparison of perfusion media and monoliths for protein and virus-like particle chromatography, *J. Chromatogr. A* 1447 (2016) 72–81.
- [33] F.-C. Wu, S.-Z. Chou, I.-L. Shih, Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter, *J. Taiwan Inst. Chem. E* 44 (2013) 846–853.
- [34] A. Demir Sezer, H. Kazak Sarilmiser, E. Rayaman, A. Cevikbas, E.T. Öner, J. Akbuga, Development and characterization of vancomycin loaded levan-based microparticulate system for drug delivery, *Pharm. Dev. Technol.* 22 (5) (2017) 627–634.
- [35] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine* 11 (2016) 673–692.
- [36] [Matche.com/](http://www.matche.com/) <http://www.matche.com/> Last access 24th September 2018.
- [37] J.M. Coulson, J.F. Richardson, R.K. Sinnott, *Chemical Engineering (Volume 6 Chemical Engineering Design)*, 4th edition, Elsevier, Oxford, 2005.
- [38] S. Sethi, M.R. Wiesner, Cost modeling and estimation of crossflow membrane filtration processes, *Environ. Eng. Sci.* 17 (2000) 61–79.
- [39] A. Vián Ortuño, *El pronóstico económico en química industrial*, 4th edition, Eudema, España, 1991.
- [40] E. Molina Grima, E.H. Belarbi, F.G. Acíen Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnol. Adv.* 20 (2003) 491–515.
- [41] N.R. Jathore, M.V. Bule, A.V. Tilay, U.S. Annature, Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production, *Food Sci. Biotechnol.* 21 (2012) 1045–1053.
- [42] S. Manandhar, S. Vidhate, N. D'Souza, Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 794–798.







# Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: Microbial vs cell-free systems

Álvaro González-Garcinuño<sup>a</sup>, Antonio Tabernero<sup>a</sup>, Gema Marcelo<sup>a</sup>, Víctor Sebastián<sup>b,c</sup>, Manuel Arruebo<sup>b,c</sup>, Jesús Santamaría<sup>b,c</sup>, Eva Martín del Valle<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza Los Caídos s/n, Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering, Aragon Institute of Nanoscience (INA), University of Zaragoza, Campus Río Ebro - Edificio I + D, C/Poeta Mariano Esquillor S/N, 50018 Zaragoza, Spain

<sup>c</sup> Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28029 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Paseo de San Vicente, 58-182, Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 March 2019

Received in revised form 17 June 2019

Accepted 17 June 2019

Available online 27 June 2019

### Keywords:

Polyfructoses

Nanoparticles

Self-assembly

## ABSTRACT

Differences between the levan obtained from bacteria and from cell-free systems were studied in this work. Results showed that both polymers are non-porous solids (type II isotherm with 20 m<sup>2</sup>/g) with a main thermal decomposition at 200 °C and a negligible value of protein adsorption. Microbial levan produced nanoparticles of 90 nm in diameter whereas nanoparticles of 110 nm were obtained with the polymer obtained from a cell-free system. Both polymers behave as aggregates depending on the critical aggregation concentration. At the same time, that concentration depends on the technique used for the polymer synthesis. Cell-free system aggregation concentration is 0.24 mg/mL whereas a concentration of 0.05 mg/mL was found for the microbial system. In both cases, the average molecular weight of the aggregate is higher than 2000 kDa. These results highlight the existence of aggregation equilibrium for both polymers that has to be taken into account for future applications.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Biopolymers are biodegradable and biocompatible materials that usually have functional groups on their side chains that can be modified to perform chemical functionalization (or reaction). Due to their particular and promising properties, their use is very interesting for several biomedical applications. Among these polymers, levan is a biopolymer constituted by fructose units bonded by  $\beta(2-6)$  linkages, with some ramifications  $\beta(2-1)$ , having different applications in biomedicine, food or energy [1].

One of the most promising characteristics of levan is its ability to form nanostructures in water by self-assembly, forming a polymeric micelle, which makes it a good carrier in drug delivery systems [2,3]. However, there is reduced information in the literature concerning the mechanism of nanoparticle formation and the key parameters that control that process (i.e. critical aggregation concentration).

Levan has been traditionally produced from different bacteria species as a component of the extracellular polysaccharide matrix. These bacteria (Gram-positive or Gram-negative), under certain growing conditions (excess of sucrose and a slightly acid pH), can secrete an enzyme (levansucrase) that is able to hydrolyze the sucrose in the culture

medium to subsequently polymerize the derived fructose units (using water as acceptor of fructose units). On the other hand, several authors have isolated the enzyme from bacteria [4,5] and a new approach for the synthesis by directly using the enzyme in a solution of sucrose is being explored. The use of cell-free systems introduces several advantages in comparison with the traditional microorganism-based synthesis, such as avoiding culture contamination, easier downstream processing and a faster polymerization reaction [6]. As an example, Szwengiel et al. [5] optimized the synthesis conditions using levansucrase from *Bacillus subtilis*, including different substrates, temperature, pH, and the effects of some cofactors such as Mg or Mn, which control the hydrolytic and transferase activity of the enzyme.

However, the differences between both syntheses on the resulting polymer properties are still unknown. In particular, for biomedical applications, properties such as molecular weight or particle size are key features regarding the stability in water, aggregation and even a possible antitumoral effect [7]. In this context, although levan nanoparticles obtained from microorganisms and their properties have been previously studied, there is still a lack of knowledge regarding nanoparticles derived from cell-free systems.

On the other hand, the main drawback of polymeric micelles (as levan or polyfructoses) for systemic administration is the disaggregation process that happens when the particles (micelles) are introduced in the blood stream. The high volume of blood reduces the concentration of nanoparticles; and if this is lower than CAC, the chains

\* Corresponding author at: Eva Martín del Valle, Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Plaza Los Caídos s/n, Salamanca, Spain.  
E-mail address: [emvalle@usal.es](mailto:emvalle@usal.es) (E. Martín del Valle).

constituting the particles will disaggregate and the drug will be released without control. Therefore, a deep study of levan physicochemical properties may help to clarify this phenomenon. In this context, our main hypothesis is that levan and polyfructoses can have a similar behavior in terms of aggregation phenomenon. Moreover, polymer properties can be modified depending on the synthesis route.

Based on the previous facts, the main objective of this work is to perform a comparison between polymers that are produced from bacteria and from a cell-free system. Both systems will be compared in addition with commercial levan from *Erwinia herbicola* and will be characterized by studying different properties regarding nanoparticle sizes and molecular weight. Moreover, studies concerning CAC and protein adsorption have been performed in order to further characterize the polymer as well as to provide information regarding the phenomenon of nanoparticle formation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbial growth and polyfructose isolation

*Acinetobacter nectaris* (CECT 8127) was selected to produce polyfructoses as was described by González-Garcinuño et al. [8] This bacterium was purchased from the Spanish type culture collection of microorganisms (CECT). The strain was cultured in Erlenmeyer flasks (volume 500 mL) (Duran, Germany), with the following culture media: 7 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Sigma Aldrich), 2.5 g L<sup>-1</sup> KHPO<sub>4</sub>, 1.6 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, and a variable amount of sucrose (from 60 to 150 g L<sup>-1</sup>). The pH of culture media was adjusted between 5.5 and 6 (with HCl 1 M). Experiments were carried out at 25 °C with a stirring speed around 150 rpm for 24 h.

Biomass growth was monitored by spectrophotometry at 600 nm (UV-1800, Shimadzu, Japan). Once the culture reached the stationary phase growth, culture broth was separated by centrifugation at 10,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804, Germany) for 10 min. The pellet was discarded and methanol was added to the supernatant (containing the polymer) in a volume proportion 80:20 (broth:methanol) for avoiding any bacteria proliferation at further stages. The mixture was then dialyzed with 3.5 kDa membranes (*Orange scientific*, Belgium) for 5 days and after that the mixture inside the dialysis bags was lyophilized (Telstar lyophilizer, Spain) at -55 °C and 0.05 bar to dry the polymer. This protocol differs from the traditional way for isolating levan or polyfructoses [9], in which ethanol is added for precipitating the polymer. In this case, ethanol was not used in order to avoid the precipitation of other compounds from the culture broth that can modify nanoparticle size, stability and water solubility [3].

### 2.2. Cell-free synthesis

Cell-free systems are based on the use of levansucrose for polymer synthesis. The enzyme used was Fructosyltransferase 68S from *Bacillus subtilis* (NATE-1384, purchased from Creative enzymes, NY, USA). The enzymatic reaction was carried out in AFORA reactors (reaction volume 100 mL) with a temperature controlled at 37 °C by a thermally-insulated jacket. The initial concentration of sucrose was 90 g L<sup>-1</sup> and the enzyme concentration was 0.2 mg L<sup>-1</sup> [5]. After 3 days, the reaction reached the maximum value of conversion, and the polymer could be isolated from the solution by its precipitation with ethanol (3 volumes ethanol per each volume of reaction media), following the method proposed by Jathore et al. [9]. In this case, ethanol was used because no culture-medium components are required for cell-free systems. The mixture was stored for 24 h at -20 °C and centrifuged during 10 min at 10,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804, Germany) to remove the supernatant. The pellet was dried by lyophilization (Telstar, -55 °C, 0.05 bar).

### 2.3. Chemical characterization (Fourier-transform infrared spectroscopy, thermo-gravimetric analysis, nuclear magnetic resonance)

A Perkin-Elmer Spectra One Instrument (Canada) was used to obtain the Infrared Spectra. KBr pellets were used and 32 spectra were recorded with a nominal resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. A Varian Mercury 200 MHz (USA) was used for recording the Nuclear Magnetic Resonance spectra on a 200 and 400 MHz for <sup>1</sup>H and a Bruker Avance 400 MHz for <sup>13</sup>C. Finally, thermo-Gravimetric Analysis was performed in a TA Instruments SDT Q600 (USA) simultaneous DTA-TGA Thermal analyzer under nitrogen atmosphere (20 mL/min) from 20 °C to 900 °C at 10 °C/min.

### 2.4. Porosity determination by BET

BET (Brunauer-Emmett-Teller) surface area was evaluated in a Tristar 3000 gas adsorption analyzer (Micromeritics Instrument Corporation). The sample gas previously outgassed at 40 °C during 3 h under vacuum and the adsorption isotherm evaluated at 77 K using N<sub>2</sub> as adsorbate over the relative pressure range of (P<sub>s</sub>/P<sub>0</sub>) from 0.01 to 0.97. The BET specific surface area was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation. The pore volume versus diameter distribution was calculated by analyzing the desorption branch of the isotherm using the Barrett-Joyner-Halenda method.

### 2.5. Composition of the polymer

The nature of the polymer can be determined by performing hydrolysis of the material to obtain its elemental units (monosaccharides). A solution of polymer (10 mg mL<sup>-1</sup>) in distilled water at pH 3.1 (with HCl 1 M) was prepared. Then, different samples were incubated at 55 °C for 6 days to induce an acid hydrolysis [10].

The obtained sugars were quantified by HPLC-MS (equipment Waters ZQ-4000, USA) with detection by refractive index Waters 410. The chromatography conditions were: flow rate 0.6 mL/min, mobile phase 100% water with sulfuric acid 0.005 M; through a column Rezex Roa Organic Acid H+, 300 × 7.8 mm.

### 2.6. Molecular weight determination

Polymer molecular weight was determined by Gel Permeation Chromatography (GPC). GPC experiments were carried out with two different columns: Ultrahydrogel 500 and Ultrahydrogel 250 (both from Waters) with polyethylene glycol/oxide as standard (molecular weight range: 0.106 to 3000 kDa). The polymer concentration was set between 1 and 2 mg/mL. The mobile phase was an aqueous solution of sodium sulfate 0.1 M, which was pumped at a flow rate of 0.8 mL/min into the column. The temperature at the refractive detector (no light scattering detector) was 40 °C and the temperature in the oven was 60 °C.

### 2.7. DLS characterization

Particle size, Z-potential and the aggregation stability of the nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer nano (Malvern Instruments, UK). Particle size distribution was measured every 24 h to study nanoparticles stability.

### 2.8. Transmission electron microscopy

Nanoparticles morphological examination was performed by transmission electron microscopy (TEM). TEM analysis was conducted on a T20-FEI Tecnai thermionic microscope (USA), operated at a voltage of 200 kV. Briefly, 25 µL of the polymer suspension was put on a carbon copper grid (200 mesh), negatively stained with phosphotungstic acid and dried at room temperature for 4 h.

## 2.9. Non-specific protein adsorption

The non-specific adsorption of proteins is one of the main drawbacks after intravenous administration of nanoparticles since it is considered as the first step for triggering an immune response, namely the non-specific destruction of antigens (foreign compounds that are recognized and phagocytized) by macrophages. The study of non-specific adsorption of the materials synthesized was carried out with Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich) as a model protein. Dry polymer was dispersed in water at different concentrations ( $1\text{--}3\text{ mg mL}^{-1}$ ) and 24 h later BSA was added to the nanoparticles suspension up to a final BSA concentration of  $1\text{ mg mL}^{-1}$ . The mixture was kept in an incubator at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight, and after that, it was precipitated with ethanol (3 volumes ethanol per each volume mixture). A Biodrop® (UK) was used to measure (at  $280\text{ nm}$ ) the free non-adsorbed protein in the supernatant. Therefore, it would be possible to know the adsorbed protein by a difference between the added BSA and the BSA in the supernatant [11].

## 2.10. Determination of CAC

CAC is the concentration above which there is a self-assembly process and single chains are reorganized to constitute nanoparticles. In order to determine the CAC for the polyfructoses in water, we used pyrene at very low concentration (saturation condition,  $\approx 10^{-7}\text{ M}$ ). Pyrene shows very clear variations in the fluorescence intensity when going from polar to non-polar environments. Moreover, the vibronic band structure in the fluorescence spectrum indicates the polarity of the medium [12]. The fluorescence intensity ratio of the third ( $386\text{ nm}$ ) to the first ( $375\text{ nm}$ ) vibronic peaks,  $I_3/I_1$ , depends on the environment of the pyrene molecules. The  $I_3/I_1$  ratio decreases when the polarity of the environment increases. These values range from 1.87 in water to 0.6 in aliphatic hydrocarbon solvents [13]. Both fluorescence intensity and the ratio  $I_3/I_1$  have been widely used to determine the CAC of different systems.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Polymer produced by cell-free system

The polymer was obtained by following the methods described in Section 2.2, and the yield was calculated as the percentage of the polymer compared to the amount of sucrose that was used as substrate. The yield ranged from 18% to 22% (mg polyfructose/mg initial sucrose). This value was higher than the value reported by Bersaneti et al. [14], who obtained a yield of about 12% or Santos-Moriano et al. [15] with a yield of around 15% in FOS polymerization with levansucrase. This

increase can be explained because of the high purity of the enzyme purchased and the optimization of the reaction conditions.

#### 3.1.1. Chemical characterization

The polymer was characterized by TGA, FTIR, H-NMR, C-NMR and BET (see supplementary information section). Results indicate that the polymer was successfully obtained. Infrared spectrum shows broad bands around  $1170\text{ cm}^{-1}$  (carbonyl C-O-C),  $1080\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyl C-OH) and  $1030\text{ cm}^{-1}$  (hydroxyl C-OH), that are typical bands for carbohydrates, as well as showing several intense peaks between  $1200$  and  $900\text{ cm}^{-1}$  [16]. Fructose compounds usually present a maximum at  $1080\text{ cm}^{-1}$  as well as a peak around  $2900\text{ cm}^{-1}$  and in the “fingerprint” region two similar shoulders at  $835$  and  $770\text{ cm}^{-1}$  [17].

On the other hand, TGA shows an initial weight loss around  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , which is caused by the removal of residual moisture. The polymer main thermal decomposition occurs around  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  (probably due to the loss of the -OH groups) and finally a less intense peak was found around  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  (final decomposition of the polymer due to the combustion). A similar TGA curve was also obtained for polyfructoses [18].

$^1\text{H}$  NMR spectrum results are similar to the results previously reported by Jathore et al. [9]. The spectrum consists in a high intensity peak about 5 ppm followed by subsequent peaks of lower intensity between 4 and 3.5 ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum results are similar to those reported by Mamay et al. (2015), where it is possible to observe seven peaks ( $104.2$ ;  $80.3$ ;  $76.3$ ;  $75.2$ ;  $69.6$ ;  $63.4$ ;  $59.8\text{ ppm}$ ) that fits with the values previously reported and indicating the presence of ramifications (see supplementary material).

BET analysis revealed a surface area of  $23\text{ m}^2/\text{g}$  with a type II isotherm characteristic of a non-porous material with an unrestricted monolayer-multilayer adsorption up to high relative pressures. This reduced surface area corresponds well with the external surface area of non-porous particles of the size obtained in this work (see below). A hysteresis type I was found for the polymer, indicating a delayed condensation phenomenon.

An acid hydrolysis followed by HPLC-MS was carried out to determine the monomer composition. The concentration of monosaccharides was  $103\text{ ppm}$  glucose,  $838\text{ ppm}$  fructose and  $0\text{ ppm}$  sucrose. Therefore, the total amount of reducing sugars was  $941\text{ ppm}$ , i.e., a yield higher than 90% (according to the initial polymer solution:  $1\text{ mg mL}^{-1}$ ).

Finally, the molecular weight was determined by GPC (Fig. 1). Fig. 1 estimates a weight average molecular weight of  $2200\text{ kDa}$ . This last value is in accordance with the molecular weight described previously for this product [19–21].

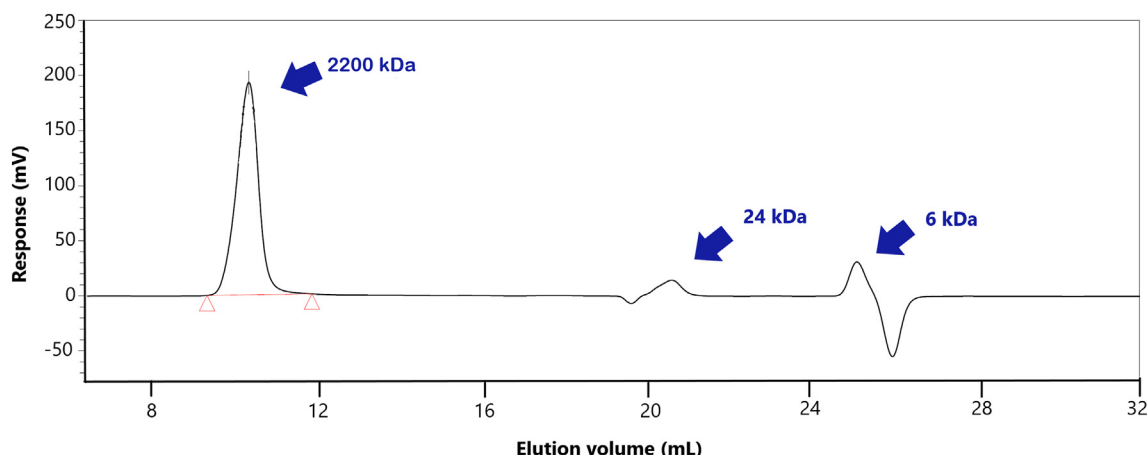


Fig. 1. GPC chromatogram of levan from cell-free system.

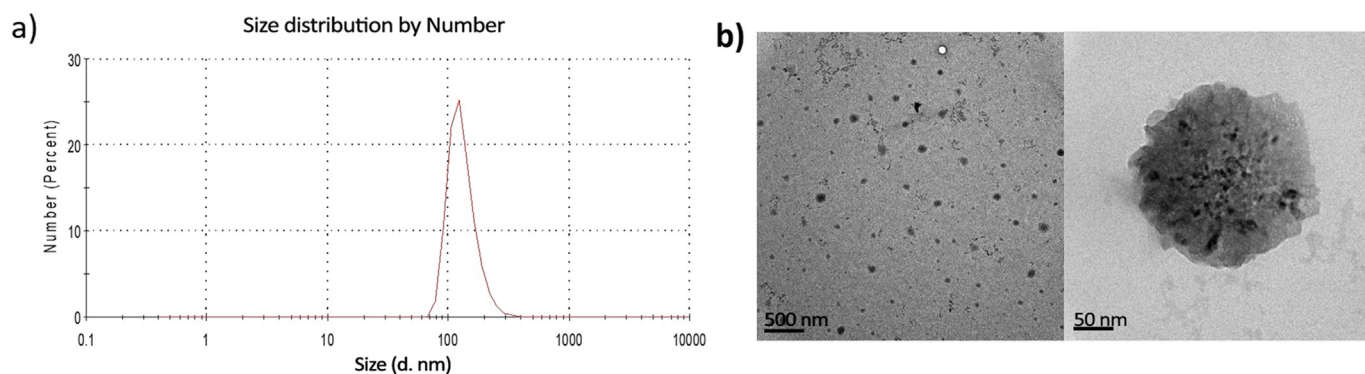


Fig. 2. A) Size distribution by number of polyfructose nanoparticles from cell-free systems. B) TEM images.

### 3.1.2. Nanoparticles characterization

This section studies the nanoparticles obtained when the polymer is produced in a cell-free system environment. Those nanoparticles were characterized by DLS and TEM (Fig. 2).

Fig. 2a illustrates particle size distribution of the nanoparticles. Nanoparticles have an average size of about 110 nm and a polydispersity index below 0.1. Zeta potential value was around  $-4$  mV (see supplementary material). This low value did not produce a negative effect on nanoparticles stability, since nanoparticle size remained stable after 15 days (supplementary material). Finally, TEM images of the spherical nanoparticles are shown in Fig. 2b. No further agglomeration is observed, in agreement with the long-term stability observed for the nanoparticles suspensions.

Nanoparticles non-specific adsorption results showed a non-specific adsorption of BSA on polyfructose nanoparticles around 0.1% (weight BSA/weight nanoparticles), which can be considered as negligible. This value suggests the potential use of these nanoparticles as carriers for systemic administration because the adsorption of non-specific proteins such as BSA has been identified as one of the main drawbacks for this purpose [22].

### 3.1.3. Study of Aggregation process

In order to verify a possible polyfructose aggregation, that phenomenon was studied to determine that CAC value. In Fig. 3, we show the fluorescence intensity (fluorescence spectra) and the fluorescence intensity at 373 nm as the concentration of the polymer increases. At the CAC there is a pronounced increase in fluorescence intensity due

to the increasing amount of pyrene in the hydrophobic region of polymer aggregates.

In Fig. 3, the onset of aggregation was determined at  $0.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Above the onset, the ratio I3/I1 has the value of 0.95 indicating pyrene is increasingly located in a hydrophobic environment.

### 3.2. Polymer from *A. nectaris*

After culturing the microorganism, cells were separated by centrifugation, and the supernatant was treated with methanol to avoid residual bacteria proliferation during the dialysis process. Optical microscopy (Leica, DM1000) confirmed that there was not cell proliferation after 5 days. After lyophilization, the process yield was determined showing a conversion percentage of  $6\% \pm 1\%$  (mass polymer produced/mass initial amount of sucrose). Previous results have shown that the amount of product increases proportionally with the initial sucrose concentration, but the conversion remains constant [23].

#### 3.2.1. Chemical characterization

Firstly, the polymer was characterized by TGA, FTIR, H-NMR, C-NMR and BET as was done with the previous system (results in supplementary information). Similar results were obtained from both types of polymer (from a cell-free system and from a microorganism). TGA shows a first peak higher than the peak obtained for the microorganism-derived polymer. That difference is attributed to the excess of ethanol that was used to extract the polymer in the cell-free system. Similar peaks were obtained at  $200^\circ\text{C}$  and  $400^\circ\text{C}$  in comparison with the polymer from cell-free system. Finally, similar results were

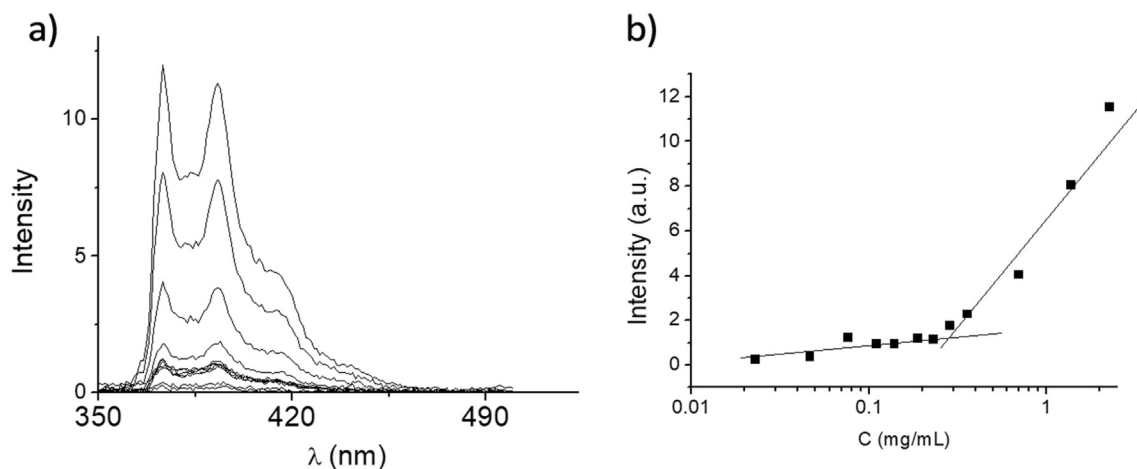


Fig. 3. A) Fluorescence spectra of pyrene ( $\lambda_{\text{exc}} = 335 \text{ nm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $[\text{Pyrene}] = 10^{-7} \text{ M}$ ) as a function of polyfructose concentration in the concentration range  $0.02\text{--}1.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . B) Plot of pyrene intensity at 373 nm as a function of polyfructose concentration.



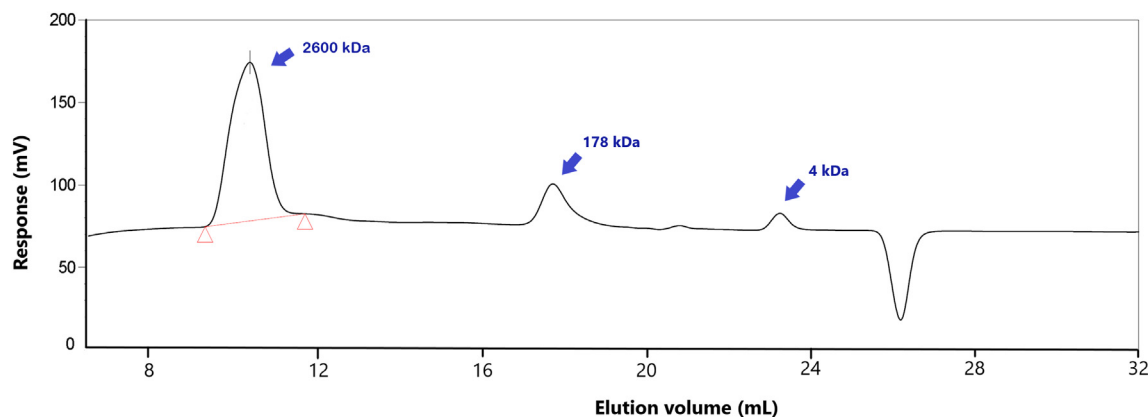


Fig. 4. GPC of levan from microorganism.

also obtained concerning H-NMR, C-NMR, infrared spectra and BET when compared with the polymer that was obtained from the cell-free system.

The composition of the polymer was determined by an acid hydrolysis followed by quantification by HPLC-MS. The concentration of mono-saccharides obtained was as follows: 46 ppm glucose, 881 ppm fructose, 0 ppm sucrose. Therefore, the total amount of reducing sugars was 927 ppm, which represents a yield over 90% (relative to the initial amount of polymer treated).

Finally, Fig. 4 illustrates the polymer molecular weight by GPC.

GPC analysis gives a value of around 2600 kDa, which is a bit bigger than the one obtained for cell-free system (400 kDa more).

Therefore, polymer chains from microorganisms are longer than the ones obtained from cell-free systems. One possible explanation is based on the environment in which the polymerization takes place. Levansucrase in cell-free systems is acting in a controlled medium (only sugars) whereas levansucrase in bacteria must polymerize in the presence of bacteria metabolites, growth factors, ATP, oligoelements and a variety of molecules that might have an effect in modulating levansucrase activity [24], and may give rise to longer polyfructose chains. An increase in the chain's length has effect on other parameters such as particle size or CAC, as it will be demonstrated in the following sections.

### 3.2.2. Nanoparticles characterization

The obtained supernatant (after cell removal) was studied by DLS in order to characterize the nanoparticles. Fig. 5 summarizes nanoparticles characterization (DLS (a) and TEM (b)).

Fig. 5a illustrates the particle size distribution by number of polyfructose nanoparticles. The Z-average size was <200 nm, which is considered appropriate for cell internalization by endocytosis and for

enhancing circulation lifetime in blood. Polydispersity Index (PDI) was around 0.1, indicating a narrow particle size distribution.

Z-potential (at pH 7.4) of  $-4$  mV was obtained for the nanoparticles with independency of the initial sucrose concentration (see supplementary information). That Z-potential is (according to particle stability criteria) too low for producing stable colloidal nanoparticles. For that reason, a 15 days' stability study was performed with the nanoparticles. Particle size remained constant during that period (see supplementary material), denoting that Van der Waals attractive forces play an important role in this system [25].

Finally, nanoparticle TEM images are illustrated in Fig. 5b. TEM results show spherical monodispersed particles, and with a smaller size in comparison with the DLS results (because of the shrinkage produced by the dehydration process during TEM sample preparation and analysis).

Non-specific adsorption was studied with BSA, and the percentage of BSA adsorbed was 12%, which represents a low value but it should be still improved in order to retard detection and reduce the immune response in potential in vivo applications. This low value in the BSA adsorption ability can be explained due to the reduced surface charge of levan nanoparticles, that lessens the particle-protein interactions, and therefore, a low interaction with the proteins of the complement system is expected. Some alternatives for non-specific adsorption such as PEGylation reduced the percentage to 8% [26].

### 3.2.3. Study of aggregation process

In order to determine the CAC of the polymer from a cell-free system, we followed the methodology explained in Section 3.1.3. The onset for the polymer aggregation was determined at  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  (Fig. 7). Above the onset, the ratio I3/I1 has the value of 0.95 indicating pyrene is increasingly located in a hydrophobic environment (Fig 6).

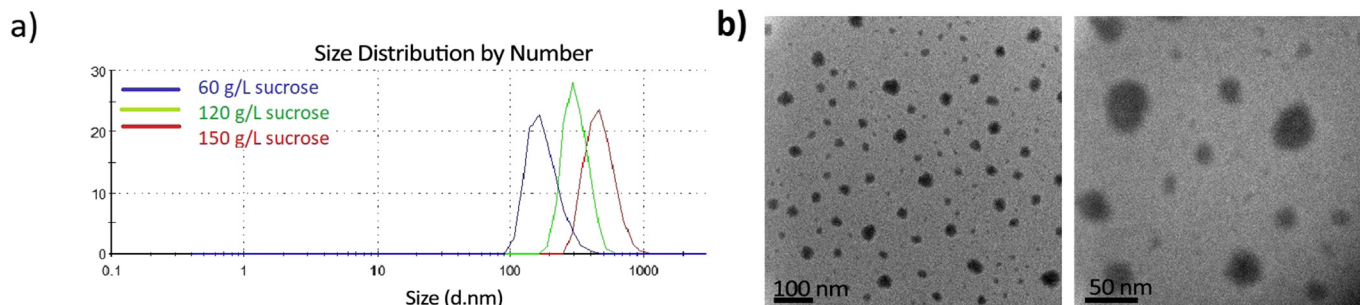
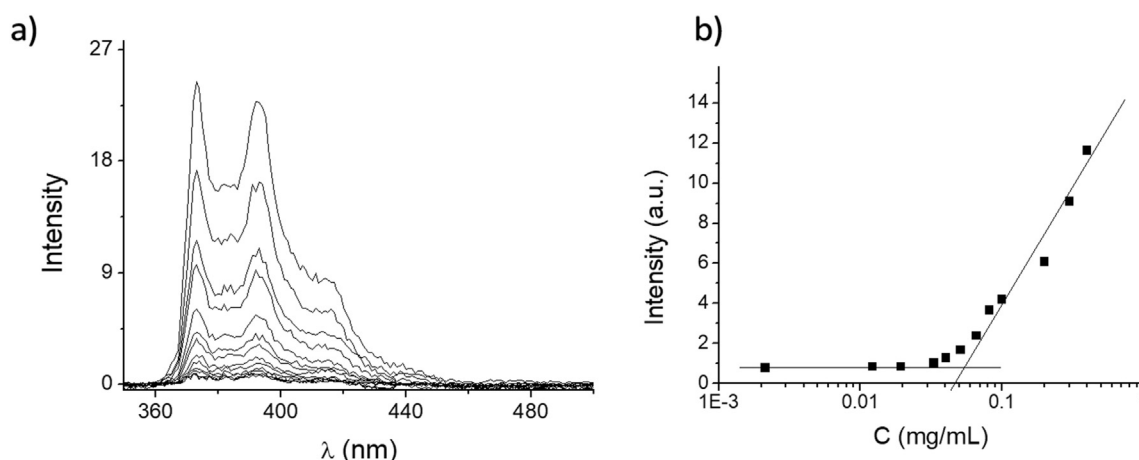


Fig. 5. A) Size distribution by number of polyfructose nanoparticles from bacteria. B) TEM image.



**Fig. 6.** A) Fluorescence spectra of pyrene ( $\lambda_{exc} = 335$  nm,  $T = 25$  °C,  $[Pyrene] = 10^{-7}$  M) as a function of levan concentration in the concentration range 0.02–1.2 mg mL $^{-1}$ . B) Plot of pyrene intensity at 373 nm as a function of levan concentration.

This value is lower than the value for another polyfructose molecule (inulin), that was reported around 0.07 mg mL $^{-1}$  [18]. According to Adams et al. [27], polymeric carriers should have a CAC around  $10^{-6}$  M to avoid a disaggregation process when they are administrated systemically. This system has a CAC value of  $3 \cdot 10^{-5}$  M, which is close to the required value.

This CAC value is five times lower than the value that was obtained for the cell-free system polymer. Therefore, these nanoparticles will be more stable if they were injected in the blood stream. This result is associated with an increase in the molecular weight, as it has been shown in the previous section. The microbial system is able to synthesize polymers with higher molecular weight, which implies lower values for CAC.

### 3.3. Comparison between both systems and commercial levan

Commercial levan from *E. herbicola* was purchased from Sigma-Aldrich with a degree of purity above 99%. Table 1 summarizes the main differences in some parameters between commercial levan and the polymers we obtained by the two different methodologies. Characterization results of commercial levan are summarized in the Supplementary material.

Levan from *E. herbicola* produced nanoparticles with a similar size to the nanoparticles we obtained from *A. nectaris* (257 and 245 nm in Z-average measurement). On the other hand, commercial levan had a higher Zeta potential (−7.62 mV) than bacterial (−4.74 mV) and cell-free (−4.35 mV) levans.

The specification sheet of commercial levan indicates a molecular weight higher than 2000 kDa, (determined by size-exclusion chromatography), which is in agreement with the values of molecular weight reported.

Concerning non-specific protein adsorption, the values for bacterial and commercial levan are very similar and always lower than 20% (12% and 15%, respectively). On the other hand, the polymer from a free cell-system reduces that value up to <1%.

**Table 1**

Comparison between polymers from bacteria, from cell-free system and commercial levan.

	Commercial	From bacteria	Cell-free system
Z-average (nm)	256.9	244.8	167.6
Size – number (nm)	175.5	90	110
Surface Zeta potential (mV)	−7.62	−4.74	−4.35
Molecular weight by GPC (kDa)	>2000	2600	2200
Non-specific protein adsorption (%)	15%	12%	<1%

The main different between the two systems is related with CAC value, which is five times lower in microbial system than cell-free system. This fact determines the application of these nanoparticles for systemic administration.

### 4. Nanoparticle formation by self-assembly

Previous results show information about polyfructose nanoparticle formation by self-assembly (Fig. 7). In both systems (bacterial and cell-free), sucrose is incorporated to the active site of the enzyme levansucrase (glucose is established as acceptor for polymerization) [step 1]; and after that, another molecule of sucrose is hydrolyzed and its fructose is transferred to form 6-kestose (trisaccharide) [step 2]. Based on our molecular weight results and CAC determination, further steps involve hydrolysis and transfructosylation to produce polyfructose chains with a variable number of residues (not possible to determine experimentally with precision). According to hydrolysis measurements, chains should have from 9 to 19 residues. However, when the CAC threshold is reached the amphiphilic nature of the molecule induces a self-assembly aggregation equilibrium of these chains (forming nanoparticles) to reduce the hydrophobic contact in water [step 3] and producing a polymer with a molecular weight about 2200 kDa (around 1500 chains for each particle). This equilibrium is reverted if the concentration is reduced below the CAC.

### 5. Conclusions

There were not significant chemical differences between the polymers obtained from levansucrase in a cell-free system and from secreted levansucrase in a culture medium. Cell-free systems give rise to smaller nanoparticles than those obtained from a microorganism although with similar zeta-potential values (−4 mV). Despite the low zeta-potential values, nanoparticles are still stable mainly due to interactions with the solvent, which assures colloidal stability due to the presence of van der Waals interactions. Moreover, it was shown that the cell-free system polymer provides a negligible non-specific protein adsorption.

A remarkable result was obtained concerning the aggregation phenomena. We obtained huge differences depending on the technique used for producing the polymer. CAC value was different for polymers from cell-free systems (0.24 mg·mL $^{-1}$ ) and from microorganism (0.05 mg·mL $^{-1}$ ) so the second one would provide a more stable system in terms of a disaggregation phenomenon. The differences in CAC value can be explained due to the differences in molecular weight of the polymer produced, where polymer from microorganism has an average molecular weight of 2600 kDa while the average molecular weight of

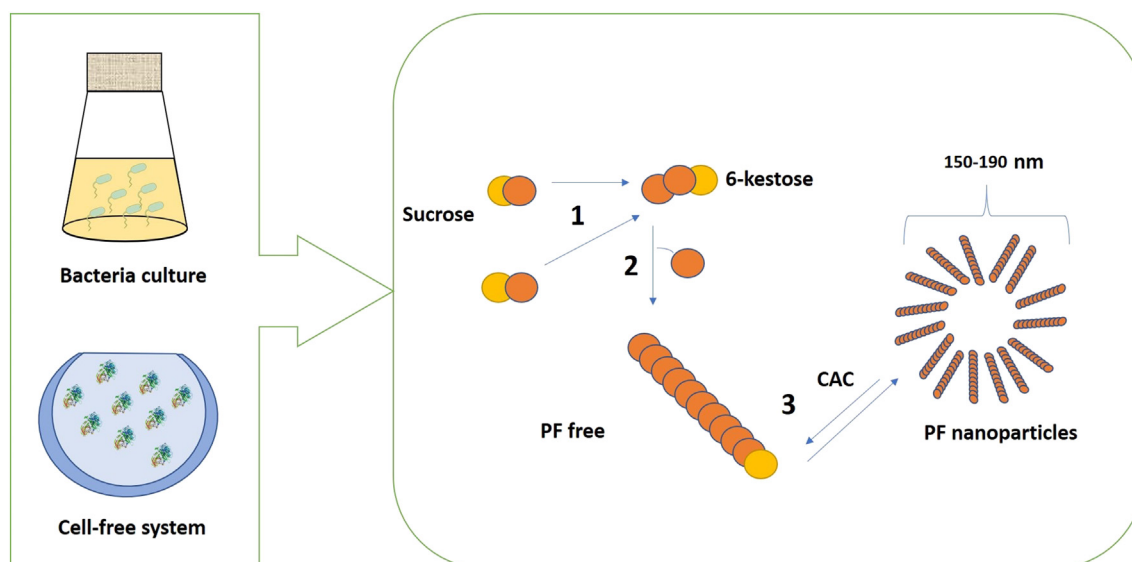


Fig. 7. Aggregation phenomenon for polyfructoses nanoparticles.

polymer from the cell-free system is 2200 kDa. This increase in molecular weight allows a lower value for aggregation stability (CAC).

Also, our results highlight that the concentration of the polymer should be taken into account before using it for any application due to the possibility of a disaggregation process.

## Acknowledgments

Authors acknowledge Junta de Castilla y León for project SA004U26. A. González-Garcinuño acknowledges Spanish ministry of Education for his PhD fellowship (FPU14/04914). Authors thank the Department of Inorganic Chemistry at University of Salamanca for the support with FTIR experiments and thank Prof. María Gracia García Martín (Department of Organic Chemistry and Pharmaceuticals of the University of Sevilla) for her help with the GPC experiments.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.128>.

## References

- [1] E.T. Öner, L. Hernández, J. Combie, Review of Levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 827–844.
- [2] A.D. Sezer, E. Rayaman, A. Çevikbaş, E.T. Development, Characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery, *Pharm. Dev. Technol.* 22 (2017) 627–634.
- [3] A. Tabernero, A. González-Garcinuño, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E. Martín del Valle, Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: stability and drug release studies, *Carbohydr. Polym.* 160 (2017) 26–33.
- [4] J.R. Xabier, K.V. Ramana, Optimization of Levan production by cold-active *Bacillus licheniformis* ANT179 and Fructooligosaccharide synthesis by its Levasucrase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181 (2017) 986–1006.
- [5] A. Szwengiel, K. Goderska, M. Gumienka, Synthesis of B(2-6)-linked fructan with a partially purified levansucrase from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 131 (2016) 1–9.
- [6] K.M. Wilding, S.M. Schinn, E.A. Long, B.C. Bundy, The emerging impact of cell-free chemical biosynthesis, *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 (2018) 115–121.
- [7] E.J. Yoon, S.H. Yoo, J. Cha, H.G. Lee, Effect of levan's branching structure on antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 34 (2004) 191–194.
- [8] A. González-Garcinuño, A. Tabernero, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E.M. Martín del Valle, Effect of bacteria type and sucrose concentration on Levan yield and its molecular weight, *Microb. Cell Factories* 16 (2017) 91.
- [9] N.R. Jathore, M.V. Bule, A.V. Tilay, U.S. Annappure, Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: characterization and medium optimization for enhanced production, *Food Sci. Biotechnol.* 21 (2012) 1045–1053.
- [10] M. Bekers, D. Upite, E. Kaminska, J. Laukevics, M. Grube, A. Vigants, R. Linde, Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *Process Biochem.* 40 (2005) 1535–1539.
- [11] H. Yoshikawa, A. Hirano, T. Arakawa, K. Shiraki, Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 1286–1291.
- [12] M. Wilhelm, C. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M.A. Winnik, J.L. Mura, G. Riess, M.D. Croucher, Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study, *Macromolecules* 24 (1991) 1033–1040.
- [13] Y. Wang, M.A. Winnik, Onset of aggregation for water-soluble polymeric associative thickeners: a fluorescence study, *Langmuir* 6 (1990) 1437–1439.
- [14] G.T. Bersaneti, N. Caldas Pan, C. Baldo, M.A.P. Celligoi, Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with potential application in the food industry, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 184 (2018) 838–851.
- [15] P. Santos-Moriano, L. Fernández-Arrojo, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, A.O. Ballesteros, F.J. Plou, Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Effect of reaction conditions, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 119 (2015) 18–25.
- [16] R.H. Marchessault, C.Y. Liang, The infrared spectra of crystalline polysaccharides, *J. Polym. Sci.* 59 (1962) 357–378.
- [17] M. Grube, M. Bekers, D. Upite, E. Kaminska, Infrared spectra of some fructans, *Spectroscopy* 16 (2002) 289–296.
- [18] A. Dan, G. Soumen, S. Moulik, Physicochemical studies on the biopolymer inulin: a critical evaluation of its self-aggregation, aggregate-morphology, interaction with water, and thermal stability, *Biopolymers* 91 (2009) 687–699.
- [19] D. Ni, W. Xu, Y. Bai, W. Zhang, T. Zhang, W. Mu, Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 29–37.
- [20] I.-L. Shih, L.-D. Chen, T.-C. Wang, J.-Y. Wu, K.-S. Liaw, Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation, *Green Chem.* 12 (2010) 1242–1247.
- [21] X. Yu, L. Li, J. Zhang, Z. Shen, C. Zhu, P. Wang, X. Jiang, Structural analysis of macromolecular Levan produced by *Bacillus megaterium* GJT321 based on enzymatic method, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1080–1089.
- [22] H. Vaisocherova, W. Yang, Z. Zhang, Z. Cao, G. Cheng, M. Piliarik, J. Homola, S. Jian, Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7894–7901.
- [23] T.A.A. Moussa, S.A.S. Al-Qaysi, Z.A. Thabit, S.B. Kadhem, Microbial Levan from *Brachyobacterium phenoliresistens*: characterization and enhancement of production, *Process Biochem.* 57 (2017) 9–15.
- [24] A. Mukherjee, S. Banerjee, R. Gachhui, Investigation of conformational changes of levansucrase isolated from *Acetobacter nitrogenifigens* strain RG1 by mercuric and cadmium ion, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 189–194.
- [25] S. Bhattacharjee, DLS and zeta-potential – what they are and what they are not? *J. Control. Release* 235 (2016) 337–351.
- [26] A. Yildirim, E. Ozgur, M. Bayindir, Impact of mesoporous silica nanoparticles functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption, *J. Mater. Chem.* 1 (2013) 1909–1920.
- [27] M.L. Adams, A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 343–355.









# **Otras publicaciones**

## **(no relacionadas**

## **con la tesis doctoral)**

---

-  **Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in *Scenedesmus abundans* and *Chlorella ellipsoidea*.** Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, J.M. Sánchez-Álvarez, E. Martín del Valle, M.A. Galán. *Bioresource Technology* 173, 334-341. Año 2014.
  
-  **Understanding and optimizing the addition of phytohormones in the culture of microalgae for lipid production.** Á. González-Garcinuño, J.M. Sánchez-Álvarez, M.A. Galán, E.M. Martín del Valle. *Biotechnology Progress* 32(5), 1203-1211. Año 2016.
  
-  **Survey of supercritical fluid techniques for producing drug delivery systems for a potential use in cancer therapy.** A. Tabenero, Á. González-Garcinuño, M.A. Galán, E.M. Martín del Valle. *Reviews in Chemical Engineering* 32(5), 507-532. Año 2016.
  
-  **Supercritical CO<sub>2</sub> assisted formation of composite membranes containing an amphiphilic fructose-based polymer.** A. Tabernero, L. Baldino, Á. González-Garcinuño, S. Cardea, E. Martín del Valle, E. Reverchon. *Journal of CO<sub>2</sub> utilization* 34, 274-281. Año 2019.





800 AÑOS

VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

1218 ~ 2018